

UNTERSUCHUNGEN ÜBER VIRULENZEIGENSCHAFTEN  
BEI *ESCHERICHIA COLI*-STÄMMEN VON  
DURCHFALLKRANKEN KÄLBERN

MANAL HASSAN ABDELHAMID AMNISE



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Untersuchungen über Virulenzeigenschaften bei *Escherichia coli*-  
Stämmen von durchfallkranken Kälbern**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Manal Hassan Abdelhamid Amnise**

Tierärztin aus Albeida, Libyen

Gießen, 2008

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:  
Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer  
Prof. Dr. H. Zahner

Tag der Disputation: 22.02.2008

***Für meine Familie***



## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Einteilung pathogener <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Darmpathogene <i>Escherichia coli</i> .....	3
2.1.1.1	Enteropathogene <i>E.coli</i> (EPEC) .....	3
2.1.1.2	Enterotoxische <i>E.coli</i> (ETEC) .....	5
2.1.1.3	Enteroinvasive <i>E.coli</i> (EIEC).....	5
2.1.1.4	Shigatoxin-bildende <i>E.coli</i> (STEC).....	6
2.1.1.5	Diffus Adhärente <i>E.coli</i> (DAEC) .....	7
2.1.1.6	Enteroaggregative <i>E.coli</i> (EAEC).....	7
2.1.1.7	Nekrotoxische <i>E.coli</i> (NTEC) .....	8
2.1.2	Harnwegspathogene und septikämische <i>Escherichia coli</i> .....	8
2.1.2.1	Zytotoxine .....	9
2.1.2.2	Cytolethal Distending Toxin (CDT) .....	9
2.1.2.3	Colicin V.....	10
2.1.2.4	Aerobaktin.....	11
2.1.2.5	Serumresistenz .....	11
2.1.2.6	Lipopolysaccharide .....	12
<b>2.2</b>	<b>Charakteristika von <i>E. coli</i>-Stämmen bei Kälberdiarrhöen .....</b>	<b>12</b>
2.2.1	Antigenität.....	12
2.2.1.1	Zellwand-Antigene (O-Antigene).....	12
2.2.1.2	Kapsel-Antigene (K-Antigene) .....	13
2.2.1.3	Geißel-Antigene (H-Antigene).....	14
2.2.1.4	Fimbrien-Antigene (F-Antigene).....	14
2.2.2	Enterotoxine.....	15
2.2.3	Anheftungsfaktoren.....	18
2.2.3.1	Fimbrienantigene der ETEC-Stämme.....	18
2.2.3.2	Äußere Membran-Proteine der EPEC und STEC.....	19
2.2.3.3	Fimbrienantigene der EAEC-Stämme.....	21
2.2.3.4	Fimbrienantigene der NTEC-Stämme.....	21
2.2.3.5	Fimbrien der extraintestinalen <i>Escherichia coli</i> -Stämme .....	22



<b>3</b>	<b>Eigene Untersuchungen .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
3.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Referenz- und Kontrollstämme .....	26
3.1.2	Herkunft des Untersuchungsmaterials.....	26
3.1.3	Laboruntersuchungen .....	26
3.1.3.1	Elektronenmikroskopische Untersuchung auf Viren .....	28
3.1.3.2	Bakteriologische Untersuchung .....	28
3.1.3.3	Identifizierung von <i>E.coli</i> .....	29
3.1.3.4	Serologische Differenzierung .....	29
3.1.3.5	Bestimmung der Antibiotika-Resistenz .....	30
3.1.3.6	Hämagglutinationstest .....	31
3.1.3.7	Serumresistenztest .....	32
3.1.3.8	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR).....	33
3.1.3.9	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
3.1.3.10	Untersuchung auf Zytotoxizität .....	39
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
3.2.1	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Kotproben auf Viren .....	41
3.2.2	Bakteriologische Untersuchung der Kotproben .....	43
3.2.3	Phänotypische Charakterisierung.....	45
3.2.3.1	Serotypisierung .....	45
3.2.3.2	Mannoseresistente Hämagglutination (MRHA).....	46
3.2.3.3	Serumresistenztest .....	48
3.2.4	Molekularbiologische Charakterisierung .....	49
3.2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	49
3.2.4.2	Einteilung der <i>E.coli</i> -Isolate in Pathovaren .....	55
3.2.4.3	<i>E.coli</i> -Pathovaren und Alter der Kälber.....	55
3.2.4.4	<i>E.coli</i> -Pathovaren und Serogruppen.....	55
3.2.4.5	Weitere Gegenüberstellungen geno- und phänotypischer Ergebnisse.....	59
3.2.4.6	Zytotoxizitätsprüfung der <i>E.coli</i> -Isolate mit Verozellen .....	67
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>83</b>

<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>124</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AA	Aggregatives Adhäsın
AAF	Aggregative adherence fimbriae
A.dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
A/E	Attaching and Effacing- <i>E.coli</i>
AFA	afimbriales Adhäsın
AggR	Aggregative adherence regulator
AIDA	antigen involved in diffuse adhesion
AMC	Amoxycillin/Clavulansäure
ATCC	American Type Culture Collection
BFP	Bundle-forming pili
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
Bp	Basenpaare
BPLS-Agar	Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	zytotoxische Dosis
CDT	Cytolethal-Distending Toxin
CF	Ceftiofur
CFA	colonization-factor antigen
cm	Zentimeter
CNF	Zytonekrosefaktor
CO	Colistin
DAEC	diffus adhärenste <i>E.coli</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
E	Erythromycin
eae	<i>E.coli</i> attaching and effacing
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	Enteroaggregative <i>E.coli</i>
EAST	hitzestabiles Enterotoxin der EAEC
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E.coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E.coli</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

ENO	Enrofloxacin
EPEC	Enteropathogene <i>E.coli</i>
Esp	extracelluar serine Protease Plasmid
ETEC	Enterotoxische <i>E.coli</i>
ExPEC	Extraintestinale pathogene <i>E.coli</i>
F	Fimbrienantigen
Fa.	Firma
FF	Florfenicol
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
Gb3	Globotriasylyceramid
Gb4	Globotetrasylceramid
Gal	Galaktose
Glc	Glucose
Glc-N	Glucosamin
Glc-Nac	N-Acetylglucosamin
GVBS	Gelatine Veronal Buffered Salzlösung
h	Stunde
HC	Hämorrhagische Kolitis
HeLa-Zellen	humane Zervixkarzinom-Zellen
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
Hly	Hämolysin
Hly <sub>EHEC</sub>	EHEC-Hämolysin
HUS	Hämolytisch urämisches Syndrom
IE	internationale Einheit
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
IMT	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
Ipa	Invasion plasmid associated proteins
k.A.	keine Angabe
kb	Kilobasen
KbE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
LA	Lokale Adhäsion
LB	Luria Bertani
LEE	Locus of enterocyte effacement
log	Logarithmus

## Abkürzungsverzeichnis

---

LPS	Lipopolysaccharide
LT	hitzelabiles Enterotoxin
M	molar
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MRHA	Mannose resistente Hämagglutination
MSHA	Mannose sensitive Hämagglutination
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl
N	Neomycin
NTEC	Nekrotoxische <i>E.coli</i>
OD	optische Dichte
OMP	Outer Membrane Protein
P	Phosphat
P	Penicillin
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pet	Plasmid encoded protein
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PN	Ampicillin
PVLP	Picornavirus-ähnliche Partikel
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTX	Repeats-in-toxins
s	Siehe
S	Streptomycin
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SF STEC	Sorbit fermentierende Shigatoxin-bildende <i>E.coli</i>
s.o.	siehe Oben
ST	hitze stabiles Enterotoxin
STEC	Shigatoxin-bildende <i>E.coli</i>
Stx	Shigatoxin

## Abkürzungsverzeichnis

---

SXT	Sulfamethoxazol/Trimethoprim
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tir	Translocated-intimin-rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Tryptose-soja-Bouillon
TTP	Thrombotisch-Thrombozytopenische-Purpura
u.a.	und andere
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPEC	uropathogene <i>E.coli</i>
UTI	urinary tract infection
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
<	kleiner als
>	größer als
≤	kleiner als oder gleich



## 1 Einleitung

Nach wie vor zählen Durchfallerkrankungen zu den häufigsten und wirtschaftlich bedeutsamsten Erkrankungen in der Kälberaufzucht. Gerade in den ersten Wochen des neonatalen Lebens können sich Störungen des Verdauungstraktes oft zu einem schwer lösbaren Bestandsproblem entwickeln. Bei fast allen bestandsweise auftretenden Durchfallerkrankungen von neonatalen Kälbern liegen infektiöse Ursachen zugrunde. Dabei handelt es sich um eine Faktorenerkrankung. In der Durchfallpathogenese zählen die bovinen Rotaviren, bovinen Coronaviren und darmpathogene *E.coli* (z. B. ETEC) zu den wichtigsten Erregern (BUTLER und CLARKE 1994; DOLL, 1995; WIELER et al., 2002). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die mit hoher Prävalenz vorkommenden verschiedenen *Escherichia coli*-Pathovaren. Im Laufe der Evolution dieser Bakterien entwickelten sich unter anderem die Enterotoxischen *E.coli* (ETEC), die Enteropathogenen *E.coli* (EPEC), die Enterohämorrhagischen *E.coli* (EHEC) und Nekrotoxischen *E.coli* (NTEC). Jedes dieser Pathovaren besitzt unterschiedliche Mechanismen zur Auslösung von Durchfall (NATARO und KAPER, 1998). Die Bestimmung und Identifizierung von Pathovaren erfolgt heutzutage vorwiegend durch molekularbiologischen Nachweis von charakteristischen Virulenzgensequenzen. Die bisher wichtigste Typisierungsmöglichkeit, die Serovarbestimmung, gilt aufgrund der hohen Variabilität in der Ausprägung der phänotypischen Merkmale als wenig aussagekräftig. Trotzdem werden in der Routinediagnostik mit Hilfe der Objektträgerschnellagglutination *E.coli*-Feldisolate orientierend auf ihre mögliche Zugehörigkeit zu bestimmten Serogruppen (hauptsächlich O8, O9 und O101) untersucht. Zusätzlich werden Kälberisolate stets auch der Untersuchung auf die Serogruppe O78 unterworfen. Die Serogruppe O78 gilt in der Tiermedizin als klassischer Erreger von Septikämien und wird fast ausschließlich im Zusammenhang mit extraintestinalen Infektionen beschrieben (WHITE et al., 1993). Im Vorfeld der Arbeit war die Beobachtung, dass im hiesigen Labor, aber auch andernorts (EWERS et al., 2004) bei Durchfallerkrankungen von Kälbern ungewöhnlich häufig *E.coli*-Stämme der Serogruppe O78 isoliert wurden, Anlass zu Spekulationen, ob Stämme dieser Serogruppe aktuell an der Auslösung von Kälberdiarrhöen beteiligt sein können.

Aus diesem Grund sollte anhand einer Bestandsaufnahme die derzeitige Situation bei der Diarrhö neugeborener Kälber aus mikrobiologischer Sicht erfasst und der oben genannte Aspekt der Serogruppe O78 besonders berücksichtigt werden.



Eine Reihe von Kotproben durchfallkranker bis zu 3 Wochen alter Kälber waren dabei bakteriologisch und virologisch zu untersuchen und die in diesem Zusammenhang isolierten *E.coli*-Stämme weitergehend zu charakterisieren. Im Einzelnen sollten folgende Fragen besonders im Fokus stehen:

1. In welchem Maße lassen sich klassische virale und bakterielle Durchfallerreger (ETEC) in dem Untersuchungsmaterial nachweisen?
2. Wie häufig finden sich *E.coli* der Serogruppe O78 in dem Untersuchungsmaterial?
3. Was für Virulenzmerkmale lassen sich an den isolierten *E.coli*-Stämmen in phäno- und genotypischer Hinsicht nachweisen und welchen *E.coli*-Pathovaren sind die Isolate zuzuordnen?
4. Lassen sich die bei den *E.coli*-Isolaten namentlich den O78-positiven Stämmen festgestellten Charakteristika mit pathogenen Wirkungen im Bereich des Darmes in Verbindung bringen?

Zur Beantwortung dieser Fragen werden neben Verfahren aus der Routinediagnostik verschiedene phänotypische Methoden wie Bestimmung des Hämagglutinationsverhaltens und der Serumresistenz, Serotypisierung und Untersuchung der Zytotoxizität der *E.coli*-Isolate im Verozelltest herangezogen. Die Erfassung von Virulenzgensequenzen für Adhäsionsfaktoren und Toxine soll zugleich der Zuordnung der Isolate zu den verschiedenen *E.coli*-Pathovaren dienen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Einteilung pathogener *Escherichia coli*

Pathogene *E.coli*-Stämme werden auf der Basis der klinischen Symptomatik und des Nachweises von spezifischen Virulenzdeterminanten (Adhäsionsfaktor, Toxin) eingeteilt. Man unterscheidet darmpathogene (intestinale) sowie harnwegspathogene und septikämische (extraintestinale) Stämme. Derzeit sind für darmpathogene *E.coli* sieben Pathovaren beschrieben: EPEC (enteropathogene *E.coli*), ETEC (enterotoxische *E.coli*), EIEC (enteroinvasive *E.coli*), STEC/EHEC (shigatoxinbildende/enterohämorrhagische *E.coli*), DAEC (diffus adhärente *E.coli*), EAEC (enteroaggregative *E.coli*) und NTEC (nekrotoxische *E.coli*). Einen Überblick über die Eigenschaften der verschiedenen Pathovaren vermittelt Tab.1 (LEVINE, 1987; NATARO und KAPER, 1998; EWERS et al., 2004).

#### 2.1.1 Darmpathogene *Escherichia coli*

##### 2.1.1.1 Enteropathogene *E.coli* (EPEC)

Enteropathogene *E.coli* sind die häufigste Ursache infektiöser Darmerkrankungen bei Kindern in Entwicklungsländern (LEVERTON und KAPER, 2005). Die Klinik wird geprägt durch wässrige Durchfälle, Erbrechen und leichtem Fieber (NATARO und KAPER, 1998). EPEC können auch für Tiere pathogen sein. EPEC verursachen vor allem beim Kaninchen große Verluste in der Jungtieraufzucht (CANTEY und BLAKE, 1977; MOON et al., 1983). Zudem werden sie auch bei Durchfallerkrankungen von Kälbern, Ferkeln, Lämmern, Hühnern, Hunden und Katzen isoliert (CANTEY und BLAKE, 1977; MOON et al., 1983; POSPISCHIL et al., 1987; JANKE et al., 1989; FISCHER et al., 1994; SUEYOSHI und NAKAZAWA, 1994).

EPEC können *in vivo* im Dün- und Dickdarmepithel charakteristische Schleimhautläsionen auslösen, so genannte Attaching-and-Effacing-Läsionen (A/E-Läsionen). Diese typischen morphologischen Veränderungen gehen mit einem Verlust der Microvilli sowie einer massiven Anreicherung von Zytoskelett-Proteinen unterhalb der bakteriellen Anheftungsstelle einher (DONNENBERG und WHITTAM, 2001).

**Tabelle 1:** Einteilung darmpathogener *Escherichia coli* (modifiziert nach NATARO und KAPER, 1998; TAUSCHEK et al., 2002; VAN BOST et al., 2003a; KIMATA et al., 2005)

Pathovar	Hauptvirulenzfaktoren	Erkrankungen beim Tier
<b>Enteropathogene <i>E.coli</i> (EPEC)</b>	Bundle forming pili (BFP) Intimin ( <i>eae</i> )	Jungtierdurchfall
<b>Enterotoxische <i>E.coli</i> (ETEC)</b>	Enterotoxin (ST und /oder LT) Fimbrien (F4, F5, F6, F17, F18ac, F41)	Neugeborenen- und Jungtierdurchfall
<b>Shigatoxin-bildende <i>E.coli</i> (STEC)</b>	Shigatoxin (Stx1 und/oder Stx2), Hly <sub>EHEC</sub> , Intimin, Fimbrien (F18ab)	Wässriger bis blutiger Durchfall, Ödemkrankheit
<b>Enteroinvasive <i>E.coli</i> (EIEC)</b>	Ipa-Proteine, Enterotoxine ( <i>Shigella</i> -Enterotoxin 2)	keine Bedeutung
<b>Enteraggregative <i>E.coli</i> (EAEC)</b>	Zytotoxine (EAST-1) Plasmid encoded protein (pet) Fimbrienartige Adhäsine (AAF/I, AAF/II)	Unbekannt
<b>Diffus Adhärente <i>E.coli</i> (DAEC)</b>	Fimbrien (F1845) 100 kDa OMP (AIDA-1) Intimin	Unbekannt
<b>Nekrotoxische <i>E.coli</i> (NTEC)</b>	Zytonekrosefaktor (CNF1, CNF2) Cytolethal Distending Toxin (CDT) Fimbrien (F17-b) Afimbriales Adhäsine (AFA)	Durchfall

**AIDA:** Antigen involved in diffuse adhesion

**EAST:** Hitzestabiles Enterotoxin der EAEC

**Ipa:** Invasion plasmid associated proteins

**Hly<sub>EHEC</sub>:** EHEC-Hämolysin

#### **2.1.1.2 Enterotoxische *E.coli* (ETEC)**

Enterotoxische *E.coli* sind eine weit verbreitete Ursache von Darmerkrankungen bei Kleinkindern und Reisenden in tropischen Ländern. Auch sind ETEC-Infektionen für schwere choleraähnliche Erkrankungen in endemischen Cholera-Gebieten verantwortlich (WOLF, 1997). Bei Tieren sind vor allem neugeborene Kälber, Lämmer und Ferkel betroffen. ETEC kommen aber auch bei Hunden und Katzen vor (SMIT et al., 1984; GANABA et al., 1995; AL-MAJALI et al., 2000; BHASKARAN et al., 2005; RIISING et al., 2005).

Enterotoxische *E.coli* zeichnen sich durch die Bildung von plasmidkodierten hitzelabilen (LT) und/oder hitzestabilen (ST) Enterotoxinen aus (MAINIL et al., 1990; PERUSKI et al., 1999; TAUSCHEK et al., 2002). Beide Enterotoxine wirken spezifisch auf die Intestinalzellen des Wirtes und werden jeweils in zwei weitere Untergruppen (LT-I und LT-II, bzw. ST-I und ST-II) unterteilt. Das hitzelabile Enterotoxin ist immunogen, das hitzestabile Enterotoxin dagegen nicht immunogen (NATARO und KAPER, 1998).

Eine Anheftung der ETEC an die Enterozyten ist die Voraussetzung für eine Infektion. Diese Anheftung wird durch zahlreiche spezies-spezifische Fimbrien vermittelt. Bei kälberpathogenen Isolaten kommen die Fimbrien F5, F17 und F41, bei porcinen Isolaten häufig die Fimbrien F4, F5, F6 und F18 vor (FAIRBROTHER et al., 1989). Bei humanen ETEC-Stämmen werden die verschiedenen Fimbrien als so genannte CFA (colonization factor antigen) klassifiziert (EVANS et al., 1977; SHIN et al., 1994; KHALIL et al., 1999; VIBOUD et al., 1999).

#### **2.1.1.3 Enteroinvasive *E.coli* (EIEC)**

Enteroinvasive *E.coli* sind in ihren biochemischen, serologischen und pathogenetischen Eigenschaften den *Shigella spp.* sehr ähnlich. EIEC verursachen beim Menschen wässrige Diarrhö (SIMI et al., 2002). Für die Tiermedizin besitzen EIEC als Durchfallerreger bisher keine Bedeutung.

Die Fähigkeit, Epithelzellen zu invadieren, ist für EIEC ein wesentliches Pathogenitätsmerkmal. Die Invasion der EIEC von Epithelzellen ist ein mehrstufiger Prozess, bestehend aus der Penetration der Epithelzelle, dem Auflösen der endozytotischen Vakuole, der intrazellulären Vermehrung, der Ausdehnung innerhalb des Zytoplasmas der Zielzelle und der Ausbreitung auf angrenzende Epithelzellen (KAPER et al., 2004). Für die Invasivität der EIEC sind Gene verantwortlich, die auf einem 140 kDa großen Plasmid lokalisiert sind, und die als *pInv* bezeichnet werden (NATARO und KAPER, 1998). Diese Gene kodieren für Typ III Sekretionsproteine, so genannte Ipa-Proteine (Invasion plasmid associated proteins), von denen IpaB, IpaC und IpaD für die Invasivität erforderlich sind (MARQUART et al.,

1996). Der Nachweis eines 63 kDa großen *Shigella* Enterotoxin-Gens (*sen*) könnte eine Erklärung dafür sein, dass EIEC auch zu Durchfällen führen (NATARO und KAPER, 1998).

#### 2.1.1.4 Shigatoxin-bildende *E.coli* (STEC)

Shigatoxin-bildende *E.coli* sind die einzigen darmpathogenen *E.coli* Stämme, die eine zoonotische Bedeutung haben. Das Hauptreservoir ist das Rind. Bei Kälbern rufen STEC-Infektionen wässrige bis blutige Durchfälle hervor (STEVENS et al., 2002b).

STEC verursachen beim Menschen eine hämorrhagischen Kolitis (HC). Zudem können STEC-Infektionen beim Menschen das hämolytisch-urämisches-Syndrom (HUS) sowie die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) auslösen (GANNON et al., 1993; NIELSEN et al., 2003; SHENG et al., 2005; ROBINSON et al., 2006). Entsprechende STEC-Stämme werden auch als enterohämorrhagische *E.coli* (EHEC) bezeichnet (RAMACHANDRAN et al., 2003).

STEC produzieren Shigatoxine. Es werden die immunologisch nicht kreuzreagierenden Toxingruppen Stx1 und Stx2 unterschieden (GIAMMANCO et al., 2002; VAZ et al., 2004).

STEC können auch Intimin bilden, das die für EPEC typischen A/E-Läsionen verursacht (PATON und PATON, 1998; HOLLAND et al., 1999; STEVENS et al., 2002a). Zusätzlich exprimieren STEC-Stämme häufig das EHEC-Hämolysin (Hly<sub>EHEC</sub>) (VAZ et al., 2004). Ein weiterer Virulenzfaktor von STEC ist das EspP (extracellular serine protease), ein 104 kDa großes plasmidkodiertes Protein. Es gehört zur Familie der Autotransporter-Sekretionsproteine (BRUNDER et al., 1997; PATON und PATON, 1998; TALBOT et al., 2005).

Für die Pathogenese ist die Fähigkeit der STEC-Stämme, das Protein Intimin zu synthetisieren, von Bedeutung. Dieses Protein wird zusammen mit anderen Virulenzfaktoren durch den bakteriellen Locus of Enterocyte Effacement (LEE) kodiert und ermöglicht die aktive Anheftung von Bakterien an die Darmschleimhaut des Wirtes unter Ausbildung von A/E-Läsionen (SANDHU und GYLES, 2002; WIELER et al., 1996; KOBAYASHI et al., 2001; BLANCO et al., 2004b; BOCZEK et al., 2006). STEC-Stämme, die *stx1*- und *eae*-Gene besitzen, werden häufiger von Kälbern als von Rindern isoliert (SANDHU et al., 1996; KOBAYASHI et al., 2003; SHAW et al., 2004).

#### **2.1.1.5 Diffus Adhärenzte *E.coli* (DAEC)**

Diffus Adhärenzte *E.coli* werden anhand ihres charakteristischen diffusen Adhäsionsmusters klassifiziert, das sie in Adhäsionsversuchen an Epithelzellen zeigen (LOPES et al., 2005). DAEC-Infektionen wurden vor allem bei Kindern mit wässriger Diarrhö nachgewiesen (GIRON et al., 1991; JALLAT et al., 1993). Zusätzlich spielen einige DAEC-Stämme eine Rolle bei Erkrankungen des Urogenitaltraktes (BLANC-POTARD et al., 2002).

DAEC produzieren zwei unterschiedliche Adhäsionsfaktoren. Das Fimbrienantigen F1845 ist sowohl chromosomal als auch plasmidkodiert. F1845 gehört zur Dr/Afa-Familie von Adhäsinen, die das Dr(a)-Blutgruppenantigen als Rezeptor erkennen (YAMAMOTO et al., 1996). Das plasmidkodierte Protein AIDA-I (adhesin involved in diffuse adherence) spielt als Adhäsionsvermittler an HeLa-Zellen eine Rolle und weist eine Größe von 100 kDa auf (NATARO und KAPER, 1998; LOPES et al., 2005).

#### **2.1.1.6 Enteroaggregative *E.coli* (EAEC)**

Enteroaggregative *E.coli* wurden im Zusammenhang mit akuten und chronischen Durchfällen bei Kindern nachgewiesen (PAIVA DE SOUSA und DANIEL DUBREUIL, 2001; OKEKE und NATARO, 2001; PIVA et al., 2003; KAPER et al., 2004). EAEC können auch bei Erwachsenen, insbesondere bei Reisenden, Durchfallerkrankungen auslösen (PAIVA DE SOUSA und DANIEL DUBREUIL, 2001; OKEKE und NATARO, 2001; BERNIER et al., 2002). Außerdem spielen die EAEC-Stämme auch bei chronischen Durchfällen von HIV-infizierten Menschen eine Rolle (OKEKE und NATARO, 2001; BERNIER et al., 2002).

Über das Vorkommen und die Bedeutung von EAEC bei Tieren fehlen Informationen. Lediglich Infektionsversuche mit Schweinen weisen auf ein pathogenes Potential solcher Stämme bei Tieren hin (TZIPORI et al., 1989). Für die Anheftung und Aggregation sind zwei flexible Fimbrien (AAF/I und AAF/II) verantwortlich (ELIAS et al., 1999). Zusätzlich werden Zytotoxine freigesetzt. EAEC bilden ein plasmidkodiertes hitzestabiles Enterotoxin (EAST-1), das dem hitzestabilen Enterotoxin der ETEC (ST-I) gleicht. Die Rolle und Bedeutung von EAST-1 innerhalb der Durchfallpathogenese konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden (NISHIKAWA et al., 2002).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass EAEC ein weiteres Toxin sezernieren. Es handelt sich dabei um ein 180 kDa großes plasmidkodiertes Protein, dessen Gen als *pet* (plasmid encoded protein) bezeichnet wird (KAPER et al., 2004). Dieses Protein gehört zur Familie der Autotransporter-Sekretionsproteine. Pet ist hitzelabil und immunogen und besitzt enterotoxische, vielleicht auch zytotoxische Aktivitäten (NAVARRO-GARCIA et al., 1998; NAVARRO-GARCIA et al., 1999). Während einige EAEC  $\alpha$ -Hämolyisin produzieren, konnte

bei nichthämolisierenden EAEC ein Protein mit der Größe von 120 kDa nachgewiesen werden, das mit dem  $\alpha$ -Hämolysin verwandt ist (BALDWIN et al., 1992; GOMES et al., 1995).

#### **2.1.1.7 Nekrotoxische *E.coli* (NTEC)**

Nekrotoxische *E.coli* produzieren ein Zytotoxin, das als Zytonekrosefaktor (CNF) bezeichnet wird. Man unterscheidet zwei verschiedene Toxintypen, das CNF1 und CNF2. Demnach werden die NTEC-Stämme in zwei Gruppen unterteilt: CNF1-produzierende *E.coli* (NTEC-1) und CNF2-produzierende *E.coli* (NTEC-2) (DE RYCKE et al., 1999).

NTEC-1 spielen beim Menschen vor allem bei Harnwegsinfektionen eine Rolle (BERTIN et al., 1998; MAINIL et al., 1999). NTEC-1-Stämme konnten auch bei Darmentzündungen von Wiederkäuern, Schweinen, Hunden, Katzen, Pferden und Kaninchen, bei Septikämien von Schweinen, bei Harnwegsinfektionen von Hunden und Katzen isoliert werden (VAN BOST et al., 2001a). NTEC-2-Stämme wurden dagegen bei Durchfallerkrankungen und Septikämien von Kälbern isoliert (DE RYCKE et al., 1999; BLANCO et al., 1998b). NTEC-2 finden sich auch bei gesunden Kälbern und Rindern (BURNS et al., 1997; BLANCO et al., 1998a).

#### **2.1.2 Harnwegspathogene und septikämische *Escherichia coli***

So genannte extraintestinale *E.coli* können Septikämie, Neugeborenenmeningitis und Harnwegsinfektionen (urinary tract infections; UTI) verursachen. Einige bestimmte Virulenzfaktoren wie Zytotoxine, Aerobaktin, Lipopolysaccharide und Adhäsine werden mit extraintestinalen *E.coli* assoziiert (CARBONETTI et al., 1986; GAY und BESSER, 1994; BERTIN et al., 1998; MOKADY et al., 2005). Die Virulenzmechanismen dieser *E.coli* sind aber komplex und nur partiell entschlüsselt. Zu ihren wesentlichen Fähigkeiten gehören die Schleimhäute zu besiedeln, die Resistenz gegenüber dem Komplementsystem, das Überleben und Vermehren in Körperflüssigkeiten mit geringer Konzentration an verfügbarem Eisen sowie die Verhinderung der Phagozytose (NGELEKA et al., 1992).

### 2.1.2.1 Zytotoxine

Das Alpha-Hämolysin der *E.coli* spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von humanen extraintestinalen Infektionen (GLYES, 1994). Alpha-Hämolysin ist ein Poren-formendes Zytolysin. Das  $\alpha$ -Hämolysin stellt den Prototypen der RTX (repeat in toxins) Familie dar. Insgesamt sind vier Gene (*hly* C, A, B und D) in einem Operon organisiert, und ein fünftes separates Gen (*toC*) kodiert die Synthese und Sekretion des Hämolysins (LAW, 2000). CNF1 und CNF2-produzierende *E.coli* werden auch aus extraintestinalen Infektionen isoliert. Hierbei scheint es, dass CNF2-produzierende *E.coli* eine besondere Rolle bei Infektionen von Kälbern und Lämmern spielen. Auch die CNF1-Bildung konnte nicht nur bei enteropathogenen, sondern auch bei uropathogenen *E.coli* nachgewiesen werden (OSWALD et al., 1991; VAN BOST et al., 2001b). CNF1 und CNF2 sind immunologisch und genetisch eng verwandte, hitzelabile Proteine mit einer Größe von 115 bzw. 110 kDa. Beide gehören in die Klasse der dermonekrotischen Toxine und besitzen homologe Aminosäuresequenzen zu Toxinen von *Bordetella bronchiseptica* und *Pasteurella multocida*. CNF1 und CNF2 induzieren zytopathische Effekte in eukaryotischen Zellkulturen. CNF wirken auf die Proteine des Zytoskeletts. Sie modifizieren die Rho-Proteine und greifen regulierend in die Physiologie des Zytoskeletts der Zellen ein. Beide Toxintypen besitzen die gleiche katalytische Aktivität, unterscheiden sich aber in ihrer Substrat-Spezifität (EL-MAZOUARI et al., 1994; BLANCO et al., 1998b; DE RYCKE und OSWALD, 2001; OSWALD et al., 1994; OSEK, 2001; MARINI et al., 2004; TAVECHIO et al., 2004). Es sind zellassozierte Produkte, die nachweislich nicht ins Zellkulturmedium abgegeben werden (BLANCO et al., 1994; 1988b und 1998b).

### 2.1.2.2 Cytolethal Distending Toxin (CDT)

Das Cytolethal Distending Toxin wurde erstmals 1987 bei *Escherichia coli* beschrieben (JOHNSON und LIOR, 1987). Sein Vorkommen ist ebenfalls bei *Campylobacter* spp., *Helicobacter* spp., *Haemophilus ducreyi*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Shigella* spp. dokumentiert. Effekte dieser Toxinfamilie findet man bei bestimmten eukaryotischen Zellkulturlinien, bei denen unter Vergrößerung der Zellen der Zelltod durch Blockierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase eintritt (VAN BOST et al., 2003b; PICKETT et al., 2004). Bei *E.coli* werden zur Zeit fünf verschiedene Toxinsubtypen beschrieben, CDT-I bis CDT-V, welche durch das Gencluster *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* kodiert werden. Im Falle von CDT-I, CDT-II, CDT-IV und CDT-V sind die Gene chromosomal verankert (MAINIL et al., 2003; JANKA et al., 2003; PICKETT und WHITEHOUSE, 1999; TOTH et al., 2003).



Cdt-III wurde auf dem Vir-Plasmid identifiziert (TOTH et al., 2003). CDT-V konnte dabei sowohl bei Sorbit-fermentierenden (SF) STEC O157:H<sup>-</sup> und zu einem geringeren Prozentsatz bei O157:H7 nachgewiesen werden. CDT hemmen die Aktivierung der cdc2-Proteinkinase (PICKETT und WHITEHOUSE, 1999). Aufgrund seiner Sequenzhomologie zu bekannten Phosphodiesterasen wird für cdtB eine DNase I-Aktivität angenommen (DERYCKE und OSWALD, 2001; TOTH et al., 2003), während cdtA und cdtC Proteine die Bindung an die CDT-Rezeptoren der Zielzellen vermitteln (PICKETT et al., 2004). CDT positive *E.coli*-Stämme stellen kein homogenes Pathovar dar, vielmehr wird dieser Virulenzfaktor auch in unterschiedlichen Kombinationen mit anderen Virulenzfaktoren gefunden, z. B. mit der Bildung von Shigatoxin, Intimin, Enterohämolysin, Zytonekrosefaktor Typ1 und 2 (CNF1, CNF2) und/oder hitzestabilem und hitzelabilem Enterotoxin (PICKETT et al., 2004). Die CDT-Bildung kann bei intestinal und extraintestinal pathogenen Bakterien gefunden werden (BOUZAIR et al., 2005).

#### **2.1.2.3 Colicin V**

Das Colicin V unterscheidet sich in einigen Merkmalen von den anderen Colicinen. Es ist ein sehr kleines Molekül mit einem entsprechend geringen Molekulargewicht. Man bezeichnet es aus diesem Grund auch als Mikrozin. Die Synthese von Colicin V wird nicht durch das SOS-System reguliert, sondern ist abhängig von dem zur Verfügung stehenden Eisen. Colicin wird nicht mittels Zelllyse freigesetzt, sondern durch aktiven Export (WATERS und CORSA, 1991). Das Colicin V von *Escherichia coli* gehört zur großen Familie der antibakteriellen Toxine. Das Colicin V ist ein häufig nachgewiesener Virulenzfaktor von Stämmen, die aus Septikämien bei Menschen und Tieren isoliert werden (CARBONETTI und WILLIAMS, 1984; LINGGOOD et al., 1987; FERNANDEZ-BEROS et al., 1990; DIAS DE SILVEIRA, et al., 2002; GOPHNA et al., 2003). Colicin V ist ein ribosomal-synthetisiertes Toxin, das von vielen *Escherichia coli*-Stämmen sowie anderen *Enterobacteriaceae* produziert werden kann (WATERS und CORSA, 1991). Die Colicin-V-Plasmide sind eine heterogene Gruppe von IncF1-Plasmiden, welche für virulenzassoziierte Eigenschaften, wie das Aerobaktin-Eisenanreicherungssystem, erhöhte Serumresistenz, Resistenz gegenüber Phagozytose und Temperatur-sensitives Hämagglutinin kodieren (WATERS und CORSA, 1991; GOPHNA et al., 2003).

#### 2.1.2.4 Aerobaktin

Für die Vermehrung nahezu aller Mikroorganismen ist Eisen essentiell. Bakterien benötigen für ihr Wachstum  $10^{-6}$  mol/l Eisen. Die Konzentration des frei verfügbaren Eisens in den Körperflüssigkeiten von Tieren und Menschen ist geringer, so dass allein dieses Eisen den Bedarf der Bakterien nicht deckt (LAFONT et al., 1987; DER VARTANIAN, 1988; LINGGOOD et al., 1987; CHIPPERFIELD und RATLEDGE, 2000). Unter Eisenmangelbedingung wird die Eisenaufnahme durch die Bakterien über Siderophore (Enterobaktin und Aerobaktin) vermittelt (BINDEREIF und NEILANDS, 1983). Das Aerobaktin-System wird durch ein Operon kodiert, das auf fünf Genen lokalisiert ist. Vier dieser Gene, *iucA*, *iucB*, *iucC* und *iucD*, sind für die Synthese von Aerobaktin verantwortlich. Das *iutA*-Gen kodiert für einen äußeren Membranrezeptor, an den schließlich die entsprechenden Aerobaktin-Eisen-Komplexe binden (HERRERO et al., 1988; MOON et al., 2004; NEILANDS, 1991). Das Operon liegt auf dem 80 kb großen Colicin-V-Plasmid (ColV-plasmid) in *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* und *Klebsiella pneumoniae*, während es bei EIEC und *Shigella spp.* die auch Aerobaktin produzieren können, auf dem Chromosom lokalisiert ist (THARIATH et al., 1993; SUAREZ et al., 1995; MOON et al., 2004).

#### 2.1.2.5 Serumresistenz

Bakterielle Serumresistenz resultiert aus einer Kombination von Faktoren. Dazu gehören O- und Kapsel-Polysaccharide, sowie äußere Membranproteine (MOLL et al., 1980; NATARO und LEVINE, 1994). Die chemische Struktur, Länge und Verteilung der O-Polysaccharide sind besonders bei unbekapselten Bakterien wichtige Determinanten der Serumresistenz. Die Expression einiger K-Antigene korreliert auch mit vorhandener Serumresistenz. In vielen Fällen verleiht die Kapselschicht zusammen mit den O-Polysacchariden Schutz vor Phagozytose (TAYLOR, 1983; WHITFIELD et al., 1994; CROSA, 1984; BURNS, et al., 1999). Der Grad des Schutzes durch die Kapselschicht variiert und hängt vom Serotyp ab. Die K1-Kapseln wirken hemmend auf die Phagozytose, da sie mit der Bindung der Bakterien an Phagozyten interferieren (EWERS et al., 2003). K1-Stämme werden vornehmlich bei Menschen mit Septikämie sowie bei Neugeborenen-Meningitis isoliert (HENKEL, 1971; KAIPAINEN et al., 2002; MERCADO et al., 2003).

### 2.1.2.6 Lipopolysaccharide

Die Mehrzahl der Symptome bei septikämischen Prozessen durch gramnegative Bakterien werden dem LPS (Endotoxin) zugeschrieben. Bei experimentell infizierten Tieren können die charakteristische Effekte wie z. B. der septikämische Schock, Hypotonie, Fieber, metabolische Azidose und disseminierte intravaskuläre Koagulation, durch die Injektion von LPS ausgelöst werden (PROULX et al., 2001; WHITFIELD et al., 1994). Dabei ist der Lipid-A-Anteil der Endotoxine für die Toxizität und somit primär für die biologische Wirkung des Wirtes verantwortlich (EWERS et al., 2003; WHITFIELD et al., 1994).

## 2.2 Charakteristika von *E. coli*-Stämmen bei Kälberdiarrhöen

### 2.2.1 Antigenität

Bei *Escherichia coli* werden O-, K- und H-Antigene unterschieden (ØRSKOV und ØRSKOV, 1992; COIMBRA, et al., 2000). Bei Vorhandensein von Fimbrien wird die Serovar durch ein F-Antigen ergänzt (O:K:H:F). Zurzeit sind bei *Escherichia coli* etwa 173 O-Antigene, 80 K-Antigene und 56 H-Antigene bekannt (ØRSKOV und ØRSKOV, 1992). Ein vollständiges Antigen-Schema, vergleichbar dem Kauffmann-White-Schema für *Salmonellen*, ist für *Escherichia coli* unvorstellbar. Die hohe Anzahl der Antigene und Kombinationen von Serovaren (O:K:H) würden die Erstellung eines detaillierten Schemas erschweren (ØRSKOV und ØRSKOV, 1992).

#### 2.2.1.1 Zellwand-Antigene (O-Antigene)

O-Antigene sind Polysaccharide der Zellwand, gegen die Antikörper synthetisiert werden. Sie sind thermostabil und werden in allen S (smooth)-Formen von *Escherichia coli* gefunden (FENG et al., 2005). S-Formen besitzen ein sLPS und zeigen prinzipiell eine Serumresistenz. Sie sind in der Lage, die Aktivierung von Komplement im Komplementsystem zu hemmen. Sie beeinflussen den alternativen Weg des Komplementsystems und verhindern nachfolgend die rezeptorvermittelte Phagozytose durch die Makrophagen. Einige Bakterien haben keine O-spezifischen Polysaccharide und bilden Rauh- (oder rough-) Formen aus (rLPS) (EWERS et al., 2003; FENG et al., 2005). R-Formen sind nicht mehr in der Lage, das Komplementsystem zu hemmen. Sie sind damit serumsensitiv. Zurzeit sind bei *E.coli* 173 O-Antigene nachgewiesen, von O1-O173 beziffert. Sieben Serogruppen (O31, O47, O67, O93, O94 und O122) wurden aber vor kurzem aus dem Schema gestrichen (SCHEUTZ et al., 2004).

Die Kälberdiarrhö hängt mit dem Auftreten bestimmter *E.coli*-Serogruppen zusammen. Nach den Untersuchungen von WIELER et al. (1996) und von PEARCE et al. (2004) sind die Serogruppen O22, O26, O103, O111, O145 und O157 besonders häufig vertreten.

Die O-Serogruppe 113 wurde nur in Spanien bei durchfallkranken Kälbern nachgewiesen (WANI et al., 2003). Die Serogruppe O116 wurde vor allem in Indien (WANI et al., 2003) und die Serogruppe O118 vor allem von durchfallkranken Kälbern in Deutschland isoliert (WIELER et al., 1998). Der Nachweis von *E.coli* O78-Isolaten aus Durchfallgeschehen ist eher selten. Auch konnten 58 % *cnf2*-positive Stämme isoliert werden, die zu ganz unterschiedlichen Serogruppen (O8, O75, O15, O55, O86, O115 und O147) gehörten (BLANCO et al., 1998b). MAINIL et al. (1990) konnte 80 % der bovine ETEC-Isolate den Serogruppen O8, O9 und O101 zuordnen. Von MERCADO et al. (2004) wurden unter 76 Isolaten von durchfallkranken Kälbern in Argentinien 15 als STEC ermittelt. 12 der STEC-Isolate erwiesen sich als Angehörige der Serogruppen O5:H, O26:H11, O111:H– bzw. O123:H3. ExPEC-Stämme wurden bevorzugt von Patienten mit Meningitis, Bakteriämie, Pyelonephritis und Prostatitis isoliert. Sieben Serogruppen kamen bei den ExPEC gehäuft vor: O1, O2, O4, O6, O18, O75 und O83 (GIRARDEAU et al., 2003).

#### **2.2.1.2 Kapsel-Antigene (K-Antigene)**

Die K-Antigene sind extrazelluläre Polysaccharide oder andere Polymere, die der Zellwand außen aufliegen. Die chemische Zusammensetzung der Kapseln variiert je nach Bakterienspezies. Die Stämme mit gleicher Kapselsubstanz bilden einen Typ. Bei *Escherichia coli* sind derzeit 80 Kapsel-Antigene bekannt (ØRSKOV und ØRSKOV, 1992). Kapseln werden nicht von allen Stämmen gebildet. Lange Zeit galt die Nicht-Agglutinierbarkeit im O-Antiserum als wichtiges Kriterium für das Vorliegen eines K-Antigens. Heute weiß man, dass auch bei Stämmen ohne K-Antigene durch bestimmte LPS-Strukturen ein unterschiedliches Agglutinationsverhalten von lebenden und gekochten Kulturen mit O-Antiseren auftreten kann (GOLDMAN et al., 1982; LIOR, 1994). Polysaccharide gibt es in vielfältigen Variationen innerhalb eines Kapseltyps. In einigen Fällen konnten bei denselben *E.coli*-Stämmen Varianten des Kapseltyps (Mutanten) isoliert werden (ØRSKOV und ØRSKOV, 1984). Diese Kapselantigene finden sich häufig in Isolaten, die eine neonatale Septikämie oder akute Pyelonephritis hervorrufen können. Die Kapselantigene besitzen verschiedene Fähigkeiten, die eine große Bedeutung für die Serumresistenz von *E.coli*-Isolaten vermuten lassen (siehe 2.1.2). Die Kapsel hemmt allgemein die Phagozytose (LEYING et al., 1990).

### **2.2.1.3 Geißel-Antigene (H-Antigene)**

Bei beweglichen *E.coli*-Stämmen kommen noch Geißelantigene vor, die aus Proteinen bestehen und gute antigene Eigenschaften besitzen. Sie werden als H-Antigene bezeichnet. H-Antigene sind hitzelabil und werden durch Erhitzen bis 100 °C komplett zerstört. Zurzeit sind 56 H-Antigene bekannt (ØRSKOV and ØRSKOV, 1992).

### **2.2.1.4 Fimbrien-Antigene (F-Antigene)**

Die *E.coli* Bakterien können feine filamentöse Oberflächenfortsätze aufweisen, die als Fimbrien (pili) bezeichnet werden. Sie sind kürzer und dünner als die Geißel. Fimbrien sind hitzelabil und haben z. T. einen tubulären Strukturaufbau mit einem Durchmesser von ca. 5-7 nm. Andere auch bei Bakterien vorkommende Fimbrien hingegen sind dünner und flexibel (2-4 nm) (MOL und OUDEGA, 1996). Die Fimbrien spielen für die Anheftung von *E.coli* an Wirtszellen eine wichtige Rolle (TO, 1984). Die Adhäsion wird durch spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt. Die entsprechenden Adhäsine der Fimbrien sind entweder über der gesamten Länge der Fimbrien verteilt, oder nur am terminalen Ende lokalisiert (BABAI et al., 2000). Am Durchfallgeschehen bei Kälbern sind vor allem ETEC-Stämme mit F5- und F41-Fimbrien beteiligt (YAMAMOTO und NAKAZAWA, 1997).

Der F165-Fimbrien-Komplex wurde bei *E.coli*-Isolaten von Schweinen und Kälbern mit Septikämie und/oder Durchfall nachgewiesen (DEZFULIAN et al., 2003). Der gereinigte F165-Fimbrien-Komplex besteht letztendlich aus zwei separaten wichtigen Proteinuntereinheiten, die als F165<sub>1</sub> und F165<sub>2</sub> bezeichnet werden (DEZFULIAN et al., 2003). Die F17-Fimbrien wurden bei *E.coli*-Isolaten von Kälbern mit Durchfall in Frankreich und Belgien, und bei Lämmern mit Nephrose in Schottland nachgewiesen (BERTIN et al., 2000) (siehe. auch 2.2.3).

### 2.2.2 Enterotoxine

Charakteristisch für ETEC ist die Fähigkeit, Enterotoxine zu produzieren (LEVINE, 1987; SHIN et al., 1994; PANIAGUA et al., 1997; WOLF, 1997; MAINIL et al., 1998; NATARO und KAPER, 1998; PERUSKI et al., 1999; VIBOUD et al., 1999; AL-MAJALI et al., 2000). Die Eigenschaft der Enterotoxinbildung ist plasmidkodiert (PANIAGUA et al., 1997). Es werden grundsätzlich zwei Enterotoxine unterschieden, das hitzelabile (LT) Enterotoxin und das hitzestabile (ST) Enterotoxin. Beide Enterotoxine wirken auf Darmepithelzellen des Wirtes. Sie werden in zwei Untergruppen unterteilt (LT-I und LT-II bzw. ST-I und ST-II). Das hitzelabile Enterotoxin ist immunogen (WOLF, 1997; PERUSKI et al., 1999; AL-MAJALI et al., 2000).

Hitzestabile Enterotoxine (ST) sind kleine monomere Toxine, die eine große Hitzestabilität besitzen. Zwischen ST-I und ST-II Enterotoxinen bestehen Unterschiede bezüglich der Struktur und des Wirkungsmechanismus. Die Gene für ST sind plasmidkodiert, selten aber auch auf Transposons zu finden (NATARO und KAPER, 1998; MAINIL et al., 1990; SHAHEEN et al., 2004). Die Klasse ST-I bindet an Glykoproteinrezeptoren, die auf dem Villus der Darmzellen lokalisiert sind. Durch Bindung von ST-I kommt es zur Aktivierung der Guanylat-Zyklase und infolge dessen zur Erhöhung des intrazellulären cGMP sowie des  $\text{Ca}^{++}$ -Gehaltes. ST-I verursacht eine Hypersekretion von Chlorid-Ionen ( $\text{Cl}^-$ ) und eine verminderte Aufnahme von Natriumchlorid durch Enterozyten, was letztlich zur Hypersekretion mit hohem Wasserverlust führt (NATARO und KAPER, 1998; AL-MAJALI et al., 2000). Bei ST-I sind zwei Subtypen bekannt, das ST-Ia und ST-Ib. Das ST-Ia ist ein Hepton mit einem Molekulargewicht von nur 2 kDa und wird von bovinen ETEC-Stämmen gebildet (AL-MAJALI et al., 2000). Während humane, aviäre und porcine ETEC ST-Ia bilden, wird ST-Ib nur von humanen Isolaten produziert (NATARO und KAPER, 1998). Das Strukturgen für ST-Ia kodiert ein Peptid von 18 Aminosäuren, ST-Ib ist 19 Aminosäuren groß (NATARO und KAPER, 1998). ST-II ist ein Peptid, bestehend aus 48-Aminosäuren (NATARO und KAPER, 1998; FUJII et al., 1991). Es wird hauptsächlich von porcinen ETEC-Isolaten exprimiert (MAINIL et al., 1998; AL-MAJALI et al., 2000).

Bei den hitzelabilen Enterotoxinen (LT) handelt es sich um oligomere Proteine, die Gemeinsamkeiten in Struktur und Funktionsweise mit dem von *Vibrio cholerae* exprimierten Cholera toxin (CT) aufweisen (WOLF, 1997; PANIAGUA et al., 1997; YAMAMOTO und NAKAZAWA, 1997; SHAHEEN et al., 2004).

Das Holotoxin LT-I besteht aus einer 28 kDa großen A-Untereinheit, sowie aus fünf identischen 11,5 kDa großen B-Untereinheiten. Die A-Untereinheit ist für die enzymatische Aktivität der Toxine verantwortlich, während die B-Untereinheiten eine Bindung an die Zellmembran ermöglichen (NATARO und KAPER, 1998; SHIN et al., 1994). LT-I gehört zu den ADP-ribosylierenden Toxinen und führt zur Erhöhung des zyklischen Adenosin-Monophosphats (cAMP) (NATARO und KAPER, 1998; TAUSCHEK et al., 2002). Die Folge ist eine sekretorische Diarrhö. LT-I wird von ETEC-Stämmen exprimiert, die pathogen für Menschen und Tiere sind.

LT-II zeigt in der A-Untereinheit eine 55-57 % ige Identität mit LT-I, die B-Untereinheiten unterscheiden sich jedoch deutlich von LT-I (NATARO und KAPER, 1998).

Der Wirkungsmechanismus gleicht dem von LT-I, wobei die Bindung an einen anderen Rezeptor erfolgt. LT-II kommt in zwei antigenischen Varianten vor, LT-IIa und LT-IIb. Die LT-II Bildung ist chromosomal kodiert und kommt bei ETEC-Stämmen von Mensch und Tier vor (SHIN et al., 1994).

Die EAEC bilden ein plasmidkodiertes hitzestabiles Enterotoxin (EAST-1) das dem hitzestabilen Enterotoxin der ETEC (ST-I) gleicht (NATARO und KAPER, 1998; BERTIN et al., 1998; JANßEN et al., 2001). EAST-1 aktiviert wie ST-I die Guanylat-Zyklase (YAMAMOTO und NAKAZAWA, 1997). Das EAST-1 wird bei EHEC durch das chromosomale *astA* kodiert. Das steht im Gegensatz zu anderen *E.coli*-Pathovaren bei denen *astA* plasmidkodiert ist (PAIVA DE SOUSA und DANIEL DUBREUIL, 2001).

Die Rolle und Bedeutung von EAST-1 innerhalb der Durchfallpathogenese konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden (NATARO und KAPER, 1998). EAST-1 Gene werden auch bei anderen pathogenen *E.coli* wie ETEC, STEC, NTEC und EPEC nachgewiesen (YAMAMOTO und NAKAZAWA, 1997; BERTIN et al., 1998; PATON und PATON, 1998).

SHIN et al. (1994) konnten unter 666 *E.coli*-Stämmen von Kälbern mit Enteritis im Bundesstaat New York, USA, nur 4,9 % ST-I- und 1 % ST-II-positive Stämme isolieren. In einer Studie von MAINIL et al. (1990) konnten bei 15,1 % von 870 in Belgien untersuchten bovinen *E.coli*-Stämmen ST-I nachgewiesen werden. SOBJINSKI. (1998) konnten bei 221 Kälbern mit Durchfall in Deutschland in 31,7 % der Kälber-Kotproben ein ST-Gen nachweisen. ST-bildende Stämme wurden von ACOSTA-MARTINEZ et al. (1980) bei 7 von 41 erkrankten Kälbern isoliert.

## Shigatoxine

*Escherichia coli*-Keime, die Shigatoxin produzieren, werden als STEC bezeichnet. Das Toxin ist ein wichtiger Virulenzfaktor. Innerhalb der Shigatoxinfamilie werden zwei immunologisch nicht kreuzreagierende Toxingruppen unterschieden, nämlich Stx1 und Stx2.

Das Stx1 ist hochkonserviert und eng verwandt mit dem Shigatoxin, welches von *Shigella dysenteriae* I gebildet wird. Innerhalb von Stx2 gibt es Sequenzvariationen mit Subtypen (NATARO und KAPER, 1998; OSEK et al., 2000; SHAW et al., 2004).

Gewisse porcine *E.coli*-Stämme der O-Gruppen 138, 139 und 141 produzieren Stx2e, eine Variante des Toxins, die für Ödemkrankheit verantwortlich ist. Stx2e-produzierende *E.coli* kolonisieren im Dünndarm, ohne lokale Schäden zu verursachen (GYLES, 1994; SHIN et al., 1994; WIELER et al., 1995; PATON und PATON, 1998).

Stx1 und Stx2 sind phagenkodiert (DE GRANDIS et al., 1987; PATON und PATON, 1998; BÜRK et al., 2003; SHAW et al., 2004).

Shigatoxine bestehen aus einer 32 kDa großen A-Untereinheit sowie fünf identischen B-Untereinheiten von je 7,7 kDa. Während die A-Untereinheit für die enzymatische Aktivität verantwortlich ist, vermittelt das B-Pentamer die Bindung des Toxins an spezifische Glykolipid-Rezeptoren der eukaryotischen Zellen (HADDAD und JACKSON, 1993; NATARO und KAPER, 1998). Die Rezeptoren für Stx1 und Stx2 sind Globotriaosylceramid-Moleküle (Gb3), während für Stx2e Globotetraosylceramid (Gb4) als Rezeptor fungiert.

Die Shigatoxine können verschiedene Wirkungen auf empfängliche Zellen haben. So können sie nach rezeptorvermittelter Internalisierung und Prozessierung ihre N-Glycosidase-Aktivität entfalten und die Proteinbiosynthese der betroffenen Zellen hemmen (NAYLOR et al., 2005).

Shigatoxin hat *in vitro* eine Toxizität auf Verozellen (FRANCK et al., 1998).

Infektionen mit Shigatoxin-bildenden *E.coli* können bei Kälbern bis zu einem Lebensalter von 2-8 Wochen Durchfallerkrankungen auslösen (WIELER et al., 1998). Bei experimentellen Infektionen an Kälbern mit einem STEC O157:H7-Stamm kam es zu profusen, auch blutigen Durchfällen (MERCADO et al., 2004).

STEC-Stämme aus Kälbern bilden entweder Stx1 oder Stx2 (SANDHU et al., 1996). In einer Arbeit von WIELER et al. (1992) wurden Stx1-positive *E.coli* häufiger von durchfallkranken Kälbern isoliert (17,8 %) als von klinisch gesunden (5,0 %), während Stx2-positive *E.coli* häufiger bei gesunden (8,9 %) als bei durchfallkranken Kälbern gefunden wurden (4,1 %). Von MERCADO et al. (2004) wurden unter 76 Isolaten von durchfallkranken Kälbern in Argentinien 15 als STEC ermittelt. Von diesen besaßen 60 % das *stx1*-Gen.



### 2.2.3 Anheftungsfaktoren

#### 2.2.3.1 Fimbrienantigene der ETEC-Stämme

Die Fähigkeit eines *E.coli*-Stammes, Enterotoxine zu bilden, reicht nicht allein aus, Durchfall zu erzeugen. Für eine ETEC-Infektion ist die Fähigkeit zur Anheftung an Enterozyten wichtig. Die Anheftung wird durch spezies-spezifische Fimbrien vermittelt (MERCADO et al., 2003). Verantwortlich für die Anheftung und Besiedelung der intestinalen Epithelien sind bestimmte Oberflächenstrukturen (BERTIN et al., 1996), die in Form von Fimbrien bei allen ETEC vorkommen.

Die Fimbrien F5, F41 und F17 kommen bei bovinen ETEC vor, die Durchfallerkrankungen hervorrufen (HERNANDEZ et al., 1989; BERTIN et al., 1996; MOL und OUDEGA, 1996; CID et al., 1999; BERTIN et al., 2000; MERCADO et al., 2003; BHASKARAN et al., 2005).

Die Fimbrien erkennen Strukturen (Rezeptoren) auf den Wirtszellen, die entweder alpha-Mannose in Oligomannoglykoproteinen, alpha-Galaktose in Globosiden oder alpha-N-Acetylneuraminsäure in Glycoproteinen enthalten. Die Adhäsion kann durch die entsprechenden Kohlenhydrate gehemmt werden. ONO et al. (1989) haben gezeigt, dass die meisten molekularen Rezeptoren Glycoproteine und Glycolipide sind. Das F5-Fimbrienantigen ist ein Protein, welches aus 159 Aminosäuren besteht. Die Adhäsion der *E.coli* mit F5-Fimbrien erfolgt durch die Bindung an Gangliosid (N-glycoloyl-GM3(NeuGc-GM3))-Rezeptoren, die auf Erythrozyten der Pferde sowie auf Schleimhäuten des Dünndarms der Ferkel und Kälber vorhanden sind (BHASKARAN et al., 2005). Die F5-Fimbrien der ETEC-Stämme sind plasmidkodiert, die F41-Fimbrien dagegen chromosomal kodiert (SHIN et al., 1994).

F17-Fimbrien bestehen aus 19,5 kDa großen Proteinuntereinheiten, die flexible und feine proteinartige Filamente mit einem Durchmesser von 3-4 nm aufweisen (EWERS et al., 2003). Auf DNS-Ebene besteht Sequenzähnlichkeit sowohl zu den Typ-1-Fimbrien als auch zu den pap-Fimbrien (P-Fimbrien). Die Adhäsion aller Subtypen der F17-Fimbrien wird durch die Bindung an N-Acetylglucosamine (Nag) vermittelt, deren entsprechende Rezeptoren auf der intestinalen Schleimhaut sowie auf Erythrozyten der Kälber vorhanden sind (EWERS et al., 2003)(siehe. **Tab. 2**).

**Tabelle 2: Eigenschaften der Fimbrien bei bovinen ETEC-Stämmen (modifiziert nach NAGY und FEKETE, 2005)**

Fimbrienart (adhäsiv)	Molekular- Gewicht(kDa)	Lokalisation des Gene	Mannoseresistente Hämagglutination	Rezeptor
F5(K99)	16,5	Plasmid	ja	Glycolipid(NeuGC-GM3)
F17(FY)	19,5	Chromosom	ja	Glycoproteine
F41	29	Chromosom	ja	Glycoproteine
F165	17,5; 19	Chromosom	ja	Glycoproteine

### 2.2.3.2 Äußere Membran-Proteine der EPEC und STEC

Intimin ist ein äußeres Membranprotein (OMP) mit einem Molekulargewicht von 94 kDa (ORDEN et al., 2002; JERSE und KAPER, 1991). Intimin wird durch das *eae*-Gen des LEE kodiert. Intimin kommt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine wichtige Rolle bei der Adhäsion der STEC und EPEC zu (SHAW et al., 2004; ADAMS et al., 2005; HORNITZKY et al., 2005). Intimin wird von vielen Bakterienspezies exprimiert und existiert in verschiedenen Typen und Subtypen (AIDAR et al., 2000; BLANCO et al., 2004a und 2004b).

Die Sequenz der N-terminalen 700 Aminosäuren bei den Intiminen von EPEC und STEC und *C.freundii* ist sehr ähnlich (NATARO und KAPER, 1998). Auch TORRES et al. (2005) bestätigen, dass die N-terminalen Bereiche hoch konserviert sind. Die letzten C-terminalen 280 Aminosäuren hingegen sind starken Variationen unterworfen. Diese C-Termini sind auch für die Unterscheidung des Intimins in zehn verschiedene Typen verantwortlich.

Intimin vermittelt den Bakterien die Fähigkeit zur Auslösung der so genannten „attaching and effacing“-Läsionen (A/E-Läsionen). Dieses histopathologische Hauptmerkmal einer EPEC-Infektion wird durch die Fähigkeit der Bakterien zur engen Anheftung an die Zellmembran der Zielzelle („attaching“) sowie zur Zerstörung der Microvilli („effacing“) und Anreicherung der Zytoskelettproteine unterhalb der bakteriellen Anheftungsstelle ermöglicht (DONNENBERG und KAPER, 1991).

Die Fähigkeit zur Auslösung der A/E-Läsionen kommt bei EPEC obligat vor. STEC-Stämme besitzen nicht immer diese Eigenschaft (HOLLAND et al., 1999). Die A/E-Läsionen entstehen in einem Drei-Stufen-Modell (NATARO und KAPER, 1998; DONNENBERG und KAPER, 1992). Die erste Stufe umfasst die initiale, nicht enge Anheftung der Bakterien an

der Zelloberfläche der Enterozyten mittels spezifischer Fimbrien. Bei EPEC handelt es sich dabei um Fimbrien vom Typ IV, die als Bundle-forming-Pili (BFP) bezeichnet werden (BLANK et al., 2000; SCALETSKY et al., 2005). Im Gegensatz zu den EPEC besitzen STEC kein BFP (TORRES et al., 2005). Die Bildung der BFP wird durch ein Cluster von 14-*bfp*-Genen auf einem 50-70 MD großen EPEC Adhäsions-Faktor-Plasmid (EAF) kodiert (HWANG et al., 2003; MELO et al., 2005; WALES et al., 2005). Die BFP sind für zwei phänotypische Anheftungsmerkmale der EPEC verantwortlich, die bakterielle Autoaggregation und die lokale Adhäsion (LA) (DONNENBERG und WHITTAM, 2001; ARANDA, et al., 2004; LEVERTON und KAPER, 2005). Die Autoaggregation ist die Bildung von multizellulären Clustern durch BFP-vermittelte Interaktionen der Bakterien untereinander (DONNENBERG und WHITTAM, 2001). Unter lokaler Adhäsion (LA) versteht man die Bildung von Mikrokolonien auf der Zelloberfläche der Epithelzellen (LEVERTON und KAPER, 2005).

Die zweite Stufe ist die EPEC-induzierte Signaltransduktion, die durch EPEC-Sekretionsproteine erfolgt. Nach der Bindung der EPEC an die Epithelzellen erfolgt die Aktivierung diverser Wirtszellsignale. Dazu gehören die "second messenger", Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Calcium ( $Ca^{2+}$ ), die möglicherweise die Phospholipase C der Wirtszelle aktivieren. Außerdem induziert EPEC die Phosphorylierung der leichten Myosinketten und die Tyrosinphosphorylierung des Tir (DONNENBERG et al., 1997).

Alle Gene die für den A/E-Phänotyp der EPEC verantwortlich sind, sind auf der 35,6 kb Pathogenitätsinsel LEE (locus of enterocyte effacement) lokalisiert. Der LEE wird in fünf Haupt-Operone unterteilt. LEE1 bis LEE 3 kodieren einen Typ-III Sekretionsapparat und LEE 4 kodiert ein Sekretionsprotein. Die Sekretionsproteine (EspA, EspB und EspD) lösen eine Kaskade von Signaltransduktionen innerhalb der eukaryotischen Zelle aus, die in der Umstrukturierung des Zytoskeletts resultiert. Ein weiteres Gen für ein Effektor-Protein (Tir) ist auf dem LEE 5 lokalisiert (CLEARY et al., 2004; LEVERTON und KAPER, 2005; WALES et al., 2005). EPEC sind in der Lage, dieses Protein in die Zielzelle zu transferieren, welches dann phosphoryliert und schließlich in die Membran inseriert wird. Dort fungiert es als Rezeptor und wird als Tir (Translocated-intimin-rezeptor) bezeichnet (NATARO und KAPER, 1998).

Die dritte Stufe der Infektion ist durch eine Intimin-vermittelte, enge Anheftung der Bakterien und Konglomeration der Aktinfasern des Zytoskeletts charakterisiert. Das Intimin bindet nur an die Tyrosinphosphorylierte Form des HP90-Proteins, bzw. des Tir, nachdem die Phosphorylierung des Rezeptors durch die EPEC aktiviert wurde (DONNENBERG et al., 1997; KAPER, 1998).

### 2.2.3.3 Fimbrienantigene der EAEC-Stämme

Im Gegensatz zu den EPEC bilden enteroaggregative *E.coli* keine charakteristischen Mikrokolonien auf der Enterozytenoberfläche, sondern lagern sich typischerweise zu Aggregaten zusammen (NATARO und KAPER, 1998). Die Bildung des charakteristischen EAEC-Adhäsionsmusters (AA) ist verbunden mit dem Vorhandensein eines 60-65 MDa großen Plasmids und mit der Ausprägung von zwei unterschiedlichen aggregativen Adhärenzfimbrien (AAF/I und AAF/II) (NATARO et al., 1992; CZECHULIN et al., 1997 und 1999; ELIAS et al., 1999; BISCHOFF, et al., 2005; HARRINGTON et al., 2006).

AAF/I werden durch das 90 kbp Plasmid von EAEC 17-2 kodiert, und für die Hämagglutination von humanen Erythrozyten und die aggregative Adhäsion an HEp2-Zellen verantwortlich gemacht (NATARO et al., 1992). Die *aaf/I*-Gene sind auf zwei Regionen verteilt und durch ein 9 kbp DNA-Fragment getrennt. Eine Region kodiert die Struktur-Untereinheit AggA, und die zweite enthält ein Gen, das einen AraC-Typ-artigen Transskriptionsaktivator namens AggR (aggregative adherence regulator) kodiert (CZECHULIN et al., 1997; OKEKE und NATARO, 2001).

Die exprimierten Fimbrien AAF/II weisen einen Durchmesser von 5 nm auf. Da eine Vielzahl von EAEC weder mit *aaf/I* noch mit *aaf/II* spezifischen-DNA-Sonden hybridisierten, wird angenommen, dass diese Stämme andere, bislang nicht charakterisierte Fimbrien exprimieren können. Einige EAEC-Stämme weisen eine Fimbrien unabhängige Adhäsion auf, welche über äußere Membranproteine (18 kDa und 30 kDa) vermittelt wird (NATARO und KAPER, 1998; OKEKE und NATARO, 2001).

### 2.2.3.4 Fimbrienantigene der NTEC-Stämme

Eine enger Zusammenhang besteht zwischen CNF1, einem  $\alpha$ -Hämolysin, P-Fimbrien und S-Fimbrien oder einem nicht-fimbrialen Adhäsin (AFA) (MAINIL et al., 1999). Auf dem Vir-Plasmid sind außer CNF2 noch andere adhäsive Virulenzdeterminanten kodiert. Dazu gehören bestimmte Fimbrien (F17b und Subunit F17C), welche die Adhäsion an die Darmschleimhaut von Kälbern vermitteln, sowie eine nicht fimbrienabhängige Adhäsion (AFA) (OSWALD et al., 1991; MAINIL et al., 1999 und 2000; VAN BOST et al., 2003b).

Zur Familie der F17-Fimbrien zählen F17a-, F17b-, F17c- und F17d- Fimbrien. Diese Subtypen sind assoziiert mit pathogenen *E.coli*-Stämmen, die aus Durchfallgeschehen und Septikämien von Rindern sowie bei Septikämien von Lämmern isoliert wurden (BERTIN et al., 1996; ERWES et al., 2003; MERCADO et al., 2003).

In einer Studie von BERTIN et al. (1996) konnte nachgewiesen werden, dass einige bovine *E.coli*-Isolate zwei unterschiedliche und vollständige Gen-Cluster verschiedener F17-Fimbrien-Subtypen besitzen (z. B. F17c-A/F17d-A oder F17b-A /F17d-A) und zum Teil diese zwei verschiedenen Subtypen auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Zusätzlich wurde in der genannten Studie festgestellt, dass das Struktur-Gen *f17d-A* eng mit den Adhäsin-Genen *f17c-G* und *f17b-G* assoziiert ist. Es wird vermutet, dass sich die verwandten Gen-Cluster der genannten F17-Untereinheiten voneinander durch Duplikation in dem entsprechenden *E.coli*-Isolat entwickelt haben (BERTIN et al., 1996).

#### **2.2.3.5 Fimbrien der extraintestinalen *Escherichia coli*-Stämme**

##### **Typ-1-Fimbrien**

F1-Fimbrien sind stäbchenförmige Strukturen, die von vielen Enterobakterien exprimiert werden, und zwar sowohl von pathogenen als auch von nicht pathogenen Stämmen. Allerdings kommen F1-Fimbrien eineinhalb bis zweimal häufiger in pathogenen Stämmen vor (MOL und OUDEGA, 1996). Sie vermitteln eine Mannose-spezifische Adhärenz an die Erythrozyten zahlreicher Tierarten, sowie an diverse andere Zelltypen, und werden aufgrund der Blockierungsmöglichkeit mit Mannose als Mannose-sensitive hämagglutinierende F1-Fimbrien (MSHA) bezeichnet (GIAMPAPA et al., 1988; HULL et al., 2002). F1-Fimbrien sind heterogene Proteine, die mehrere Untereinheiten besitzen. Die größte Untereinheit bildet das FimA-Protein (major subunit). Zusätzlich existieren kleinere Proteine, die auch als Nebenproteine angesprochen werden (u. a. FimF-, FimG-, FimC- und FimH-Protein). Die Kodierung dieser Proteine erfolgte über das chromosomal lokalisierte *fim(pil)*- Gen-Cluster, das insgesamt neun Gene umfasst, wie beispielweise die Regulator-Gene *fimB* und *fimE*, die Struktur-Gene *fimC* und *fimD* sowie das *fimH*. Als Produkt des letztgenannten *fimH* wird dem FimH-Protein eine maßgebliche Rolle im Hinblick auf die adhäsiven Eigenschaften der F1-Fimbrien zugesprochen. Die Adhäsion „FimH“ der Typ 1-Fimbrien wird durch Anbindung an verschiedene mannosylierte Glykoproteine vermittelt (SCHEMBRI et al., 2000; MULVEY, 2002).

**P-Fimbrien**

Zahlreiche extraintestinale pathogene *E.coli*-Isolate tragen P-Fimbrien. Diese heteropolymorphen, proteinartigen Fasern sind Mannose-resistente hämagglutinierende Fimbrien (MRHA) und kommen bei Stämmen vor, die bei Menschen und Hunden Infektionen der oberen Harnwege, aber bei Schweinen auch Septikämien verursachen (DOZOIS et al., 1992; BERTIN et al., 2000). Sie vermitteln eine Gal( $\alpha$ 1-4)Gal-spezifische Bindung an Glykolipid-Isorezeptoren, die von epithelialen Wirtszellen exprimiert werden. Somit wird die bakterielle Besiedlung des Wirtsgewebes und die Entzündungsreaktion des Wirtes gefördert (JOHNSON et al., 2000). *E.coli*-Isolate mit P-Fimbrien agglutinieren Erythrozyten von Menschen, die ein Antigen-P-Blutgruppensystem tragen (HACKER et al., 1985; FAIRBROTHER et al., 1992). P-Fimbrien werden durch das *pap*-Gen-Cluster kodiert. Es ist chromosomal lokalisiert und umfasst insgesamt 11 Gene (*papA-papK*) (MAINIL et al., 1997). Die Genprodukte sind bislang in 11 serologischen Varianten (F7-1, F7-2 und F8-F16) bekannt. Die Gal( $\alpha$  1-4)Gal-spezifische Bindung wird durch *papG* vermittelt, das an der Spitze der Fimbrien lokalisiert ist. Bislang konnten drei verschiedene Klassen (I, II und III) von *papG*-Fimbrien identifiziert werden, die wiederum jeweils bestimmte Rezeptoren bevorzugen (MOL und OUDEGA, 1996). Die antigene Diversität wird durch die variable Peptidsequenz des *papA*-Moleküls, der großen strukturellen Untereinheit der P-Fimbrien verursacht. *PapA*-Moleküle werden in hundert bis zu tausend Kopien in einer Fimbrie gefunden. Die *E.coli*-Wildstämme besitzen bis zu drei Kopien des gesamten *pap*-Operons. Jedes Operon kann bis zu drei verschiedene P-Fimbrien-Antigene exprimieren, da sogar innerhalb eines *pap*-Operons verschiedene *papA*-Allelen vorkommen können (JOHNSON et al., 2000).

*E.coli* mit P-Fimbrien binden bevorzugt an Epithelzellen in der Niere, wo auch Rezeptoren dafür nachgewiesen wurden. Die überwiegende Mehrzahl der *E.coli*-Isolate bei der Pyelonephritis des Menschen exprimiert P-Fimbrien. So treten P-Fimbrien, besonders bei unkomplizierten Fällen auf, bei denen keine funktionellen oder anatomischen Abnormalitäten des Harntraktes und keine prädisponierenden Erkrankungen vorliegen (MULVEY, 2002).

## **S-Fimbrien**

Viele extraintestinale *E.coli* bilden so genannte S-Fimbrien, die auf dem *sfa*-Operon kodiert sind (MAINIL et al., 1997). S-Fimbrien sind assoziiert mit einer erhöhten Adhärenz an vaskuläres Epithel *in vitro* und einer erhöhten Virulenz in Tiermodellen (NATARO und LEVINE, 1994). S-Fimbrien exprimierende Stämme binden an ein  $\beta$ -GalNaC-1,4  $\beta$ -Gal der menschlichen Epithelzellen der Nieren. *E.coli*-Isolate mit S-Fimbrien werden häufig bei Neugeborenenroseptis und Meningitis nachgewiesen (HOSCHÜTZKY et al., 1989; BABAI et al., 2000; MULVEY, 2002).

## **Afa-8-Fimbrien**

Die afimbrialen Adhäsine (AFA) sind durch das *afa*-Operon kodiert. AFA wird von Stämmen aus Urogenitalinfektionen und aus dem Blut exprimiert (MAINIL et al., 1997). Aufgrund verschiedener Untersuchungen in den letzten 20 Jahren konnte die Existenz verschiedener *afa*-Gen-Cluster nachgewiesen werden.

Diese Gen-Cluster sind strukturell verwandt, kodieren aber antigenetisch völlig unterschiedliche Adhäsine. Dafür ist die sehr starke Heterogenität des *afaE* verantwortlich. Bei tierpathogenen *E.coli* kommen die *afa7*- sowie *afa8*-Gene vor. Vor allem das *afa8* zeigt eine höhere Prävalenz in *E.coli*-Isolaten, die aus extraintestinalen und intestinalen Infektionen erkrankter Tiere stammen. Dieses Gen-Cluster setzt sich aus den Genen *afaA* und *F* für die Transkription, *afaB* als periplasmatisches Chaperon-Gen, *afaC* für die äußeren Membranproteine, *afaD* als Invasin-Gen und *afaE* als Adhäsions-Gen zusammen (LALIOUI et al., 1999; GERARDIN et al., 2000; LE BOUGUENEC et al., 2001).

Afa 8-Gene lassen sich häufig in bovinen sowie porcinen nekrotoxischen *E.coli*- Stämmen nachweisen. In diesen positiven Isolaten findet man häufig auch F17- sowie P-Fimbrien. In insgesamt 250 untersuchten *E.coli*-Stämmen, die aus verschiedenen Krankheitsgeschehen isoliert wurden, ließ sich per DNS-DNS-Hybridisierung sowie Polymerase-Kettenreaktion lediglich in 46 Isolaten (18 %) das *afa8* Gen nachweisen (GERARDIN et al., 2000). LALIOUI et al. (1999) konnten das *afa8* in 23 von 25 untersuchten Isolaten nachweisen. Zusätzlich zu CNF1 tragen bestimmte *afa8*-positive Isolate Gene für weitere Virulenzfaktoren, einschließlich *pap*, *sfa*, *f17A*, *ClpG* (CS31A) und *hlyA*, die häufig auch in extraintestinalen pathogenen *E.coli* (ExPEC) ermittelt werden. Diese Virulenzgene sind entweder auf einem großen Plasmid oder auch chromosomal lokalisiert.

### **F165-Fimbrien**

Der F165 Fimbrien-Komplex wurde bei *E.coli*-Isolaten von Ferkeln und Kälbern mit Septikämie und/oder Durchfall nachgewiesen (HAREL et al., 1993; FAIRBROTHER et al., 1992; DEZFULIAN et al., 2003). Die F165-Fimbrien werden von Erythrozyten in Anwesenheit der Mannose gebunden (MRHA, Mannose-resistente-Hämagglutination) (DEZFULIAN et al., 2003). Der gereinigte F165-Fimbrien-Komplex besteht aus den zwei separaten wichtigen Proteinuntereinheiten, F165<sub>1</sub> und F165<sub>2</sub> (FAIRBROTHER et al., 1992). F165<sub>1</sub> und F165<sub>2</sub> sind serologisch und genetisch eng verwandt und sind Proteine mit einer Größe von 19 kDa bzw. 17,5 kDa. F165<sub>1</sub> Fimbrien sind durch das *foo*-Operon kodiert, und gehören zur P-Fimbrien-Familie (BERTHIAUME et al., 2004). F165<sub>2</sub>-Fimbrien werden durch das *fof*-Operon kodiert, und haben große Ähnlichkeiten zu den F1C/S Fimbrien (DEZFULIAN et al., 2003).



### **3 Eigene Untersuchungen**

#### **3.1 Material und Methoden**

##### **3.1.1 *Escherichia coli*-Referenz- und Kontrollstämme**

Für die nähere Charakterisierung der aus dem Feldmaterial (s. 3.1.2) isolierten *E.coli*-Stämme wurden verschiedene phäno- und genotypische Merkmale herangezogen, deren Evaluierung an Hand einer Reihe von Referenz- und Kontrollstämmen erfolgte. Diese sind mitsamt ihrer Serovarzugehörigkeit, Virulenzgene, Herkunft und Stammbezeichnung in Tabelle 3 aufgelistet.

Die Stämme wurden zur längerfristigen Lagerung in Luria-Bertani-Medium (s. Anlage) mit Glycerin bei -70 °C tiefgefroren bzw. zur kurzfristigen Lagerung auf Blutagarplatten ausgestrichen und bei 4 °C aufbewahrt.

##### **3.1.2 Herkunft des Untersuchungsmaterials**

Ausgangspunkt für die nachfolgend beschriebenen weitergehenden Untersuchungen waren 95 Kotproben von bis zu 3 Wochen alten durchfallkranken Kälbern, die in dem Zeitraum von März 2003 bis Juni 2004 an das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere eingeschickt wurden. Die Proben stammten von Patienten des Klinikums (Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, sowie Klinik für Wiederkäuer und Schweine) der Justus-Liebig-Universität-Giessen oder aus verschiedenen Tierarztpraxen im Einzugsbereich des Institutes.

##### **3.1.3 Laboruntersuchungen**

93 der 95 Kotproben wurden einer elektronenmikroskopischen Untersuchung auf Viren sowie alle 95 einer bakteriologischen Routine-Untersuchung unterzogen. Die isolierten *E.coli*-Stämme wurden außerdem auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit geprüft.

**Tabelle 3: Liste der verwendeten *E.coli*-Referenz- und Kontrollstämme**

Stamm	Serovar	Virulenzfaktoren/-gene	Herkunft	Referenz
<b>TTP-1</b>	O157:H-	<i>stx1, stx2, eae</i>	Mensch	WIELER et al., 1992
<b>B41</b>	O101:H-	<i>fanA, fim41A, esta</i>	Kalb	SMITH et al., 1967
<b>H10407</b>	O78:K80:H11	<i>eltB-lp, esta</i>	Mensch	EVANS et al., 1975
<b>E38</b>	O78:H-	k.A.	Mensch	ØRSKOV et al., 1977
<b>EDL933</b>	O157:H7	<i>stx1, stx2, eae, hly<sub>EHEC</sub></i>	Mensch	O'BRIEN et al., 1983
<b>17-2</b>	O3:H2	<i>EA</i>	Mensch	VIAL et al., 1988
<b>E2347/69</b>	O127:H6	<i>bfpA, EAF, eae</i>	Mensch	S.SCOTAND
<b>C600</b>	K12	k.A.	k.A.	-
<b>J96</b>	O4:K6	<i>papC, sfaD-E</i>	Mensch	LE BOUGUENEC et al., 1992
<b>RKI98-10282</b>	k.A.	<i>ial</i>	k.A.	-
<b>IMT 1413</b>	O78:K80	<i>iucD, cdt-III, cnf2, cnf1/2, f17A</i>	Rind	IMT
<b>IMT 1520</b>	O78:K80	<i>afa8E, iucD</i>	Rind	IMT
<b>BM2-10</b>	O88:H25	<i>sfaD-E</i>	Kalb	DE RYCKE et al., 1990
<b>P3633/03</b>	O78:K80	<i>cdt-IV</i>	Kalb	IHIT

**Erläuterungen:** k.A. = keine Angabe., **IMT** = Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, **IHIT** = Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen.

### 3.1.3.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung auf Viren

Kälberkotproben wurden zu diesem Zweck im Verhältnis 1:10 (w/v) in Eagles Minimal Essential Medium suspendiert, durch niedertourige Zentrifugation von groben Kotpartikeln geklärt und der Überstand für 1h bei 100000 x g zentrifugiert (ZIMMER et al., 1991).

Der Bodensatz und eine geringe Menge des Überstandes wurden sodann in phosphatgepufferte NaCl-Lösung (pH 7,4) aufgenommen und durch Beschallen im Ultraschallbad resuspendiert. Es schlossen sich die Adsorption der Suspension an ein mit Formvar befilmtes Kupfernetz sowie die Kontrastierung des Präparates mit 2 %-iger Phosphorwolframsäure (pH 7,0) an. Danach folgte die Durchmusterung jedes Präparates im Elektronenmikroskop (EM10 CR, Fa. Zeiss, Oberkochen) bei durchschnittlich 25000-facher Vergrößerung über jeweils ca.10 min.

### 3.1.3.2 Bakteriologische Untersuchung

Zur Untersuchung der Kotproben auf bakterielle Durchfallerreger wurden die Proben auf Blutagar (mit 5 % defibriertem Schafblut, Fa. Merck, Darmstadt), Gassner-Agar (Fa. Merck, Darmstadt) und auf BPLS-Agar (Brillantgrün-Phenolrot Laktose-Saccharose-Agar, Fa. Merck, Darmstadt) ausgestrichen. Zusätzlich wurden ein Minca-Agar (s. Anlage) sowie zur Anzüchtung von *C. perfringens*, ein Traubenzuckerblutagar nach Zeissler (s. Anlage) beimpft. Bis auf letzteren wurden die Agarplatten über Nacht bei 37 °C bebrütet und anschließend ausgewertet. Die Bebrütung des Zeissleragars erfolgte anaerob in entsprechenden Anaerobiertöpfen (Fa. Oxoid, Wesel) unter Verwendung von AnaeroGen<sup>TM</sup> Beuteln (An 25, Fa. Oxoid, Wesel) zur Entwicklung einer anaeroben Atomsphäre ebenfalls über Nacht bei 37 °C.

Zur Anreicherung von evtl. vorhandenen *Salmonellen* wurden die Kotproben außerdem in jeweils 2 x 2 Salmonellen-Anreicherungsmedien verimpft (Tetrathionat-Bouillon, Rappaport-Vassiliadis-Bouillon, Fa. Merck, Darmstadt). Deren Bebrütung erfolgte bei 37 °C bzw. 43 °C. Nach 24 und 48 h Inkubation schloss sich jeweils eine Abimpfung aus der Bouillon auf Gassner- und BPLS-Agar an, nach 24 h Bebrütung bei 37 °C bzw. 43 °C wurden die Platten auf Wachstum von Laktose-negativen, d.h. Salmonella-verdächtigen Kolonien geprüft.

Bei Verdacht auf Salmonellen folgte die Prüfung dieser Kolonien mit einem omnivalenten Salmonella-Antiserum (Sifin GmbH, Berlin) in der Objektträgerschnellagglutination. Bei positiven Ausfall erfolgte die Bestätigung über die biochemische Kontrolle der Reinkultur in der „Bunten Reihe“.

### 3.1.3.3 Identifizierung von *E.coli*

Von den gewachsenen Laktose-positiven Bakterien wurden insgesamt fünf phänotypisch möglichst unterschiedlich aussehende, als *E.coli*-verdächtig angesprochene Kolonien zum Erhalt von Reinkulturen subkultiviert. Diese wurden anschließend hinsichtlich ihres Aussehens auf Gassneragar und Blutagar (Hämolyse?) beurteilt.

Anschließend erfolgte ihre biochemische Identifizierung in der „Bunten Reihe“ unter Berücksichtigung folgender Reaktionen: Cytochromoxidase Reaktion (negativ), Oxydations-/Fermentationstest mit Glukose (fermentativer Abbau der Glukose); H<sub>2</sub>S-Bildung im Eisen-Zwei-Zucker-Agar nach Kligler (negativ), Indol-Bildung aus Tryptophan (positiv), Harnstoffspaltung (negativ), Ammoniumzitratsverwertung (negativ), Gasbildung beim Glukoseabbau (positiv), Säurebildung aus Laktose (meist positiv), Mannitol (positiv); Saccharose (überwiegend negativ), Sorbitol (überwiegend positiv), Inositol (negativ), Bildung einer Lysin-dekarboxylase (positiv), Bildung einer Ornithin-dekarboxylase (positiv), Gelatinespaltung (negativ), Voges-Proskauer-Reaktion (negativ); Beweglichkeitsprüfung im Hitchensagar (überwiegend positiv).

### 3.1.3.4 Serologische Differenzierung

Für die Untersuchungen in der Objektträgerschnellagglutination standen eine kleine Auswahl von *E.coli*-Antiseren zur Verfügung, die von der Außenstelle Dessau des seinerzeitigen BGVV Berlin bezogen worden waren. In einzelnen handelte es sich um folgende Antiseren: O8:K87; O9:K35; O78:K80; O101:K28; O101:K30 und O101:K32. Die isolierten *E.coli*-Reinkulturen wurden zunächst mit einem zusätzlich vorhandenen polyvalenten Antiserum, welches außer O8:K87 alle genannten Antiseren umfasste, sowie mit dem O8:K87 Antiserum getestet. Zu diesem Zweck wurde von dem Blutagar entnommenes Kulturmateriel auf einem Objektträger in einem Tropfen Antiserum verrieben und nach mehrmaligen Schwenken auf eine evtl. Agglutinatbildung geprüft. Bei Vorliegen einer positiven Reaktion mit polyvalentem Antiserum folgte die Prüfung solcher Stämme mit den Einzelseren, sowie als negative Kontrolle, eine Überprüfung mit isotonischer NaCl-Lösung zum Ausschluss von Spontanagglutinationen.

Agglutinationsreaktionen von nativen Bakterienkulturen mit dem Antiserum O78:K80 wurden schließlich zusätzlich auf ihre Spezifität geprüft, indem solche Isolate in einem zweiten Test, nach einer einstündigen Erhitzung des suspendierten Kulturmateriels bei 100 °C, erneut mit O78:K80-Antiserum vermischt wurden. Nur wenn auch der zweite Ansatz positiv ausfiel wurde ein Isolat der Seroovar O78:K80 zugeordnet.

Zum Nachweis von F5-Fimbrien fand ein ebenfalls vorhandenes F5-Antiserum Verwendung. Zu diesem Zweck wurden zur Objekträgeragglutination die auf dem Minca-Agar gewachsenen Kolonien eingesetzt, da nur bei ihnen aufgrund der Zusammensetzung dieses Agarmediums nicht die Ausbildung einer die Fimbrien maskierenden Kapsel zu erwarten war. Bei positiven Ausfall der Probe wurden die in Frage kommenden Kulturen zur Erzielung von Reinkulturen auf Blut- und Gassneragarplatten überimpft.

### 3.1.3.5 Bestimmung der Antibiotika-Resistenz

Die Prüfung der *E.coli*-Isolate auf ihre Antibiotika-Empfindlichkeit erfolgte im Agardiffusionstest. Dieser Test basierte auf dem Prinzip der radialen Diffusion von Wirkstoffen, die mit einem Träger (Testplättchen) auf einen zuvor flächenhaft mit dem Prüfstamm beimpften Nähragar aufgelegt worden waren. Während der anschließenden Bebrütung wird das Wachstum empfindlicher Isolate im Diffusionsbereich des Wirkstoffes in Form eines Hemmhofes unterdrückt.

Der Durchmesser eines solchen Hemmhofes ist ein direktes Maß für die Empfindlichkeit eines Bakterienstammes. Die verwendeten Testplättchen (Becton Dickinson GmbH Heidelberg; Oxoid, Wesel) waren mit folgenden Wirkstoffen beschickt:

Penicillin	10 µg	Ampicillin	30 µg
Streptomycin	25 µg	Enrofloxacin	5 µg
Tetracyclin	30 µg	Gentamycin	10 µg
Erythromycin	15 µg	Neomycin	30 µg
Florfenicol	30 µg	Colistin	25 µg
Ceftiofur	30 µg	Sulfonamide	300 µg
Amoxycillin/ Clavulansäure	30 µg	Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	25 µg

Als Nährboden diente Müller-Hinton-Agar (Oxoid, Wesel) mit 5 % defibriniertem Schafblut. Pro Isolat wurden 2 Agarplatten jeweils mit 45 µl einer zuvor von einer Bakterienkolonie in einem Milliliter NaCl hergestellten Bakteriensuspension beimpft und die Suspensionen gleichmäßig über die Oberfläche der Agarplatte ausgespatelt. Anschließend wurden die Testplättchen mit Hilfe von Dispensern auf die Agarplatten aufgelegt, die Nährböden zur Vordiffusion über 30 min bei Raumtemperatur gelagert und danach bei 37 °C inkubiert. Nach einer Bebrütungsdauer von 16-20 h erfolgte die Auswertung in Form einer Messung der im Bakterienrasen entstandenen Hemmhöfe.

### 3.1.3.6 Hämagglutinationstest

Zur Feststellung ihrer hämagglutinierenden Eigenschaften wurden die *E.coli*-Isolate mit Erythrozytensuspensionen von Schaf, Rind, Pferd, Meerschweinchen, und Huhn inkubiert.

Während das Schafblut von institutseigenen Tieren stammte, wurden das Rinder- und Pferdeblut dankenswerterweise von der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere des hiesigen Fachbereiches zur Verfügung gestellt. Zur Gerinnungshemmung wurden ca. 8 ml Blut in 3,5 ml 3,8 %-iger Natriumcitrat-Lösung aufgenommen. Blut von Meerschweinchen und von Hühnern wurde über den Handel (Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln) bezogen.

Sämtliche Blutarten wurden zunächst zentrifugiert (10 min bei 3000 rpm) und die im Bodensatz enthaltenen Erythrozyten anschließend 2 x mit isotonischer NaCl-Lösung gewaschen. Sie wurden im Kühlschrank für maximal 3 Tage aufbewahrt.

Für die Hämagglutinationsversuche (modifiziert nach HAGBERG et al., 1981) wurden die *E.coli*-Stämme in 10 ml Minca-Bouillon (ohne Glucose) über 18 h bei 37 °C angezüchtet und im Anschluss daran für 25 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in isotonischer NaCl-Lösung aufgenommen und zur Bestimmung der Bakteriendichte eine Keimzählung mittels log 10-Verdünnung und anschließender Ausplattierung einer definierten Menge (0,01 ml) pro Verdünnungsstufe durchgeführt. Danach wurde die Bakteriendichte stets auf  $1,2 \times 10^9$  KBE/ml eingestellt.

Parallel dazu erfolgte zu jedem Versuchsansatz die frische Herstellung einer 1 %-igen Erythrozytensuspension in isotonischer NaCl-Lösung. Zur Feststellung, ob eine im Hämagglutinationstest auftretende Agglutination mannose-sensitiv oder -resistent war, wurde die Hälfte der 1 % igen Erythrozytensuspension mit 1 % D-Mannose bzw. Methyl- $\alpha$ D-Mannopyranosid (INC Biomedical Inc) versetzt.

Die Durchführung der Hämagglutinationstests erfolgt in Mikrotiterplatten mit einem Boden in U-Form (Fa. Greiner, Nürtingen). Mittels Eppendorfpipette wurden dazu in je eine Vertiefung gleiche Mengen (100  $\mu$ l) Bakterien- und Erythrozytensuspension bzw. Bakteriensuspension und mannose- bzw. mannopyranosidbehandelte Erythrozytensuspension pipettiert. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C und anschließend bis zur Auswertung 2 h bei 4 °C inkubiert.

Bei jedem Versuchsansatz dienten Ansätze mit dem bekannten F5 und F41-positiven *E.coli*-Stamm „B41“ (O101:H) (WOODWORD und WRAY, 1990) und einem Fimbrien-negativen *E.coli*-K12 Stamm C600 als positive und negative Kontrolle. Zum Ausschluss einer spontanen Hämagglutination wurden je ein Ansatz isotonische NaCl-Lösung mit unbehandelten und mit behandelten Erythrozytensuspensionen mitgeführt.

Als positiv wurde eine klare Agglutination der Erythrozyten, als negativ eine runde, glatte Knopfbildung infolge Sedimentation der Erythrozyten angesehen. Außerdem wurde registriert, ob eine Vorbehandlung der Erythrozyten mit Mannose bzw. Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid ihre Agglutination im Test mit dem *E.coli*-Stamm aufhob (Mannose-sensitive Agglutination) oder nicht beeinflusste (Mannose-resistente Agglutination).

### 3.1.3.7 Serumresistenztest

In diesem Test wurde ermittelt, ob *E.coli*-Isolate durch kolostrumfreies Kälberserum in ihrer Vermehrungsfähigkeit beeinflusst werden. Das Ausbleiben eines solchen Einflusses wurde als "Serumresistenz" interpretiert. Die hier angewandte Methodik basierte auf der Arbeit von FECTEAU et al. (2001).

Die dabei eingesetzten Seren stammten von neugeborenen Kälbern, denen vor der ersten Kolostrumaufnahme von Mitarbeitern der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere aus dem hiesigen Fachbereich Blut entnommen wurde. Bis zu ihrem Gebrauch wurden die Seren bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Durchführung dieses Tests wurden die *E.coli*-Feldstämme über Nacht in Tryptose-Soja-Bouillon bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  angezüchtet. Daran schlossen sich eine 1:10-Verdünnung eines Aliquots dieser Bouillon und eine erneute Bebrütung dieser Verdünnung auf einem Schüttelinkubator bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  über 1.5 h an. Von der Verdünnung wurden 10  $\mu\text{l}$  in 990  $\mu\text{l}$  Gelatine-Veronal-Puffer-NaCl (+2 M  $\text{MgCl}_2$ , +0,3 M  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,35) aufgenommen und anschließend 50  $\mu\text{l}$  mit 450  $\mu\text{l}$  Präkolostrumkälberserum gemischt. Darauf folgte der eigentliche Serumresistenztest in Form einer 3-stündigen Inkubation der Bakterium-Kälberserumsuspension bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zur Auswertung des Ansatzes dienten vergleichende Keimzahlbestimmungen vor und nach der 3-stündigen Inkubation. Zu diesem Zweck wurden an beiden Zeitpunkten jeweils 10  $\mu\text{l}$  eines Ansatzes in log 10-Verdünnungsreihen mit isotonischer NaCl-Lösung über 4 Stufen ausverdünnt sowie aus jeder Verdünnungsstufe jeweils 2 x 10  $\mu\text{l}$  im Doppelansatz auf Blutagarplatten aufgetropft und mit der dabei verwendeten Pipettenspitze geringfügig ausgezogen. Nach Eintrocknung der Inokulate erfolgte die Bebrütung der Blutagarplatten über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zur Auswertung wurden Blutplatten von der Verdünnungsstufe ausgewählt, auf denen die *E.coli*-Bakterien in voneinander abgrenzbaren Einzelkolonien sichtbar waren und gut ausgezählt werden konnten. Je nach dem, ob die Bakterienzahl eines *E.coli*-Isolates in dem 3 h-Intervall gleich geblieben war oder/sich verringert hatte, wurde das Isolat als sensitiv, intermediär oder resistent beurteilt.

### 3.1.3.8 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Zur Untersuchung und Charakterisierung der *E.coli*-Feldisolate in Hinblick auf ihre Ausstattung mit Virulenzgenen kamen verschiedene PCR-Tests zum Einsatz. Hierbei handelte es sich um 3 Multiplex-PCRs, in denen verschiedene Primer verwandt wurden und die eine Zuordnung der Feldstämme zu den verschiedenen *E.coli*-Pathovaren ermöglichten. Für der Herstellung der Templates wurden die *E.coli*-Stämme über Nacht in 2 ml LB-Medium bei 37 °C unter Verwendung eines Schüttelinkubators (180 Impulse/min) angezüchtet. Im Anschluss wurden 100 µl der Bakteriensuspension für 2 min gekocht und jeweils 3 µl für die PCR-Tests verwandt. Die Herstellung der benötigten Oligonukleotide erfolgte durch die Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg. Sie wurden mit A.bidest auf eine Konzentration von 100 pmol /µl eingestellt und bei –20 °C gelagert.

**Multiplex-PCR:** Zur Erkennung von enterotoxischen, “attaching and effacing” sowie Shigatoxin-bildenden *E.coli* wurden die Isolate mit der Multiplex-PCR nach FRANCK et al. (1998) getestet. Die hierzu als Primer verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgelistet. Ein Reaktionsansatz (30 µl) enthielt neben 18,6 µl A.bidest, 1xNH<sub>4</sub>-Mix als Reaktionspuffer (3 µl, Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (1,2 µl, PAN Biotech GmbH, Aidenbach), Primermix (3 µl, 0,5 µM je Primer), Nukleotid-Mischung (1 µl, 133 µM je Nukleotid) sowie Panscript-DNA-Polymerase (0,2 µl, 0,03 U/µl) und 3 µl der jeweiligen Bakteriensuspension (s.o). Als Positivkontrollen dienten die *E.coli*-Stämme B41, H10407 und TTP-1, als Negativkontrolle wurde A.bidest verwendet. Die Reaktionsansätze wurden jeweils mit 20 µl Mineralöl überschichtet und umgehend in den Thermozykler überführt. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema:

1 x	5 min	94 °C	Eingangsdenaturierung,
30 x	1 min	94 °C	Denaturierung,
	1 min	55 °C	Annealing Temperatur,
	1,5 min	72 °C	Extension,
1 x	5 min	72 °C	abschließende Inkubation.

Die Auftrennung der polymerisierten Fragmente erfolgte in 3 %-igen Agarosegelen.



**Tabelle 4: Übersicht über die in der Multiplex-PCR nach FRANCK et al. (1998) verwendeten Primer**

Gen	Primer- Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Lage des Amplifikats	Datenbank- Eintrag-Nr
<i>stx1</i>	F-Stx1-1	TTCGCTCTGCAATAGGTA	280-834	Z36899
	F-Stx1-2	TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT		
<i>stx2</i>	F-Stx2-1	GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTTC	206-323	L11078
	F-Stx2-2	AGGGGTCGATATCTCTGTCC		
<i>eae</i>	F-Eae A-1	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT	1060-1484	Z11451
	F-Eae A-2	AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA		
<i>fim41A</i>	F-F41-3	GCATCAGCGGCAGTATCT	288-667	X14354
	F-F41-4	GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT		
<i>fan A</i>	F-F5-1	TATTATCTTAGGTGGTATGG	90-403	M35282
	F-F5-2	GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTC		
<i>eltB-IP</i>	B-LT-1	GGCGTTACTATCCTCTCTAT	33-305	M15363
	B-LT-2	TGGTCTCGGTCAGATATGT		
<i>esta</i>	F-STa-1	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA	294-483	M25607
	F-STa-2	AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA		

**NTEC-PCR-Tests:** Zur Identifizierung von Feldisolaten als nekrotoxische *E.coli* wurden sie in zwei NTEC-PCRs nach VAN BOST et al. (2003a) getestet. Die Reaktionsansätze (Gesamtvolumen 30 µl) entsprachen in ihrer Zusammensetzung im Prinzip dem der Multiplex-PCR. Die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Folgende *E.coli*-Stämme wurden stets als Positivkontrollen mitgeführt: IMT 1413, IMT 1520, P3633/03, BM2-10, und J96. Als Negativkontrolle diente *A.bidest*.

Die Amplifikation der verschiedenen Genabschnitte im Thermozykler hatten folgende Abläufe:

<b>I Genabschnitte außer <i>f17A</i>, <i>sfaD-E</i> und <i>papC</i></b>			
1 x	3 min	94 °C	Eingangsdenaturierung,
30 x	30 sec	94 °C	Denaturierung,
	30 sec	60 °C	Annealing Temperatur,
	1 min 30 sec	72 °C	Extension,
1 x	7 min	72 °C	abschließende Inkubation.

<b>II</b>	<b>Genabschnitte <i>f17A</i>, <i>sfaD-E</i> und <i>papC</i></b>		
1 x	5 min	95 °C	Eingangsdenaturierung,
30 x	30 sec	95 °C	Denaturierung,
	30 sec	57 °C	Annealing Temperatur,.
	1 min	72 °C	Extension,
1 x	7 min	72 °C	abschließende Inkubation.

Für die Auftrennung der Fragmente wurden 2 %-ige Agarosegele verwendet.

**Tabelle 5: Übersicht über die in den NTEC-PCRs nach VAN BOST et al. (2003a) verwendeten Primer**

Gen	Primer- Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Lage des Amplifikats	Datenbank- Eintrag-Nr
<i>cnf2</i>	cnf2_for cnf2_rev	TATCATACGGCAGGAGGAAGCACC GTCACAATAGACAATAATTTCCG	1942-3182	U01097
<i>cnf1/2</i>	cnf1/2_for cnf1/2_rev	TTATATAGTCGTCAAGATGGA CACTAAGCTTTACAATATTGA	962-1595 892-1525	AF483829 U01097
<i>cdt-III</i>	cdt-III_for cdt-III_rev	GAAAATAAATGGAATATAAATGTCCG TTTGTGTCGGTGCAGCAGGGAAAA	995-1550	AJ508930
<i>cdt-IV</i>	cdt-IV_for cdt-IV_rev	CCTGATGGTTCAGGAGGCTGGTTC TTCCTCCAGAATCTATACCT	34-359	AY162217
<i>afa8E</i>	afa8E_for afa8E_rev	CTAACTTGCCATGCTGTGACAGTA TTATCCCCTGCTTAGTTGTGAATC	6135-5857	AF072900
<i>iucD</i>	iucD_for iucD_rev	AAAAGTGACATCGGATGGC GTATTTGTGGCAACGCAGAA	876-1128	M18968
<i>f17A</i>	f17A_for f17A_rev	GCAGAAAATTCAATTTATCCTTGG CTGATAAGCGATGGTGTAAATTAAC	3-543	AF055308
<i>sfaD-E</i>	sfaD-E_for sfaD-E_rev	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGCAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	2373-2780	AY436351
<i>papC</i>	papC_for papC_rev	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	4649-4976	X61239

***E.coli*-Differenzierungs-PCR:** Diese PCR diente als Verfahren zur Differenzierung der Feldisolate in enteroaggregative, enteroinvasive, enterotoxische, enteropathogene oder enterohämorrhagische *E.coli*, entsprechend der Beschreibung von NGUYEN et al. (2005). Auch hier waren die Reaktionsansätze (30 µl Gesamtvolumen) prinzipiell wie die der Multiplex-PCR zusammengesetzt. Die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide und ihre Sequenzdaten sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Bezeichnungen der für die Positivkontrollen eingesetzten *E.coli*-Kontrollstämme lauteten: 17-2, EDL933, H10407, E2347/69 und RKI 98-10282. Zur Negativkontrolle wurde *A.bidest* verwendet. Das Amplifikationschema im Thermozykler war folgendermaßen aufgebaut:

1 x	5 min	94 °C	Eingangsdenaturierung,
30 x	20 sec	94 °C	Denaturierung,
	20 sec	55 °C	Annealing Temperatur,
	1 min	72 °C	Extension,
1 x	7 min	72 °C	abschließende Inkubation.

Es schloss sich die Auftrennung der polymerisierten Fragmente in 3 %-igen Agarosegelen an.

**Tabelle 6: Übersicht über die in der Differenzierungs-PCR nach NGUYEN et al. (2005) verwendeten Primer**

<b>Gen</b>	<b>Primer- Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Lage des Amplifikats</b>	<b>Datenbank- Eintrag-Nr</b>
<i>EA</i>	EA_for	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	52-674	X81423
	EA_rev	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT		
<i>eae</i>	eae_for	CACACGAATAAACTGACTAAAATG	489-864	Z11541
	eae_rev	AAAAACGCTGACCCGCACCTAAAT		
<i>LT</i>	LT_for	TCTCTATGTGCATACGGAGC	886-1207	S60731
	LT_rev	CCATACTGATTGCCGCAAT		
<i>ST</i>	STIb	CCTGACTCTTCAAAAAGAGAAAATTAC	367-460	M58746
	STIc	GATTACAACAAAGTTCACAGCAGT		
<i>bfpA</i>	bfpA_for	TTCTTGGTGCTTGCGTGTCTTTT	2630-2996	U27184
	bfpA_rev	TTTTGTTTGTGTATCTTTGTAA		
<i>SHIG</i>	SHIG_for	CTGGTAGGTATGGTGAGG	29482- 29799	AY206439
	SHIG_rev	CCAGGCCAACAATTATTTCC		
<i>VT1</i>	VT1_for	GGAGAGTCCGTGGGATTACG	1547-1676	AF461172
	VT1_rev	AGCGATGCAGCTATTAATAA		
<i>VT2</i>	VT2_for	ACCGTTTTTCAGATTTTGACATA	377-674	AY143337
	VT2_rev	TACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT		

### **3.1.3.9 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der kontinuierlichen Auftrennung und Identifizierung der polymerisierten DNS-Fragmente. Der Nachweis der genspezifischen PCR-Amplifikate erfolgte in 2 bzw. 3 %-igen Agarosegelen. Hierzu wurden 1,2 g bzw 1,8 g Agarose in 60 ml Elektrophoresepuffer (1 x TAE, siehe Anlage) durch Aufkochen gelöst. Nach Hinzufügen von 1 µl Ethidiumbromidlösung (0,1 µg/ml) wurde die Gellösung in eine Gelkammer mit einem Probenaschenkamm gegossen und zur Polymerisation abgekühlt.

Anschließend wurden die Kämme entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (1 x TAE) eingebracht. Vor dem Auftrag der Proben in die Probenaschen wurden die PCR-Amplifikate zunächst im Verhältnis 1:6 mit 6 x Loading Puffer gemischt und hiervon 5 µl in je eine Probenasche gegeben. Zur Bestimmung der molekularen Masse der einzelnen Genfragmente wurde stets der Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fa. MBI Fermentans GmbH, St. Leon-Rot) mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der Genfragmente erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes an die Gelkammer (100 V, Laufzeit 1-2,5 h). Die Sichtbarmachung der Amplifikate erfolgte durch UV-Licht.

### 3.1.3.10 Untersuchung auf Zytotoxizität

#### Toxin-Präparation

Pro *E.coli*-Isolat wurden 20 ml LB-Medium mit 3-4 Kolonien beimpft und über 16-18 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen in einem Schüttelinkubator (180 Umdrehungen/min) bebrütet. Anschließend wurden die Ansätze über 30 min bei 4 °C und 3290 x g zentrifugiert (Eppendor fzentrifuge 500R). Der Überstand wurde in 2 ml Eppendorfröhrchen erneut über 10 min bei 13-14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, in neue 2 ml Eppendorfröhrchen überführt und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert. Des weiteren wurde das nach der ersten Zentrifugation des LB-Mediums gewonnene Bakterienpellet in 2 ml Polymyxin B-Lösung (1mg/ml isotonische NaCl) resuspendiert und 45 min bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator (180 Umderehungen/min) inkubiert. Hieran schloss sich wiederum eine Zentrifugation an (30 min, 4 °C, 3290 x g). Der Überstand wurde in ein 2 ml Eppendorfröhrchen überführt und erneut zentifugiert (10 min, Raumtemperatur, 13-14000 rpm). Danach wurde der Überstand vorsichtig gewonnen und in einem neuen Eppendorfröhrchen bei -70 °C zwischengelagert.

#### Kultivierung der Testzellen

Als Zellkulturen dienten Verozellen (ATCC Nr. CRL-1587, LGC-Promochem GmbH, Wesel), die in Plastikzellkulturflaschen (80 cm<sup>2</sup>) für 72-96 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Konzentration und Wasserdampfsättigung kultiviert wurden. Als Nährmedium fand RPMI-Medium (s. Anlage) Verwendung. Die Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen geteilt. Hierzu wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit Hepes-Puffer gespült und die Flüssigkeit erneut entfernt. Nach Zugabe von 0,25 %-iger Trypsinlösung und EDTA-Puffer erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 37 °C.

Nach dieser Inkubationszeit wurde die Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert und die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Hieran schloss sich ein Zentrifugationsschritt zur Pelletierung der Zellen an (7 min, Raumtemperatur, 202 x g). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert. Ein Aliquot von 20 µl wurde 1:10 (v/v) mit Trypanblau-Lösung versetzt und die Anzahl lebender Verozellen anschließend in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die für die Zytotoxizitätstests erforderliche Zelldichte ( $4 \times 10^5$  Verozellen/ml) wurde im Anschluss durch Zugabe der entsprechenden Menge an RPMI-Medium eingestellt.

### **Verozell-Zytotoxizitätstest**

Für alle *E.coli*-Isolate wurden die Verozellversuche im Dreifachansatz durchgeführt und der zytotoxische Effekt berechnet. Die von den *E.coli*-Stämmen gewonnenen Überstände und Pellet-Lysate wurden zunächst 1:10 (v/v) mit isotonischer NaCl verdünnt und anschließend in F96-Mikrotiterplatten (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) überführt (50 µl/ Vertiefung). Als Positivkontrolle dienten Überstand und Lysate von *E.coli* EDL-933, als Negativkontrolle die von *E.coli* K12 Stamm C600. Es folgten die Zugabe der Verozellen ( $4 \times 10^4$  Zellen in 100 µl/ Vertiefung) und die Bebrütung der Versuchsansätze über 4 Tage im Inkubator mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C.

Abgelesen und ausgewertet wurden die Ansätze zum einem durch mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie und zum anderen mit Hilfe des kolorimetrischen MTT-Tests in der Modifikation von TADA et al. (1986). Auswertungskriterium war dabei die durch photometrische Messung des Umsatzes von 3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) ermittelte Stoffwechselaktivität der Zellen.

Dazu wurden zu den Vertiefungen an Ende der 4-tägigen Inkubation 25 µl einer MTT-Lösung hinzugefügt und die Platten unter Schwenken (136 Umdrehungen/min) über weitere 4h bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion folgte danach die Zugabe von 100 µl 10 %-iger SDS-Lösung zu jeder Vertiefung und eine Fortsetzung der Inkubation über 18-20 h bei denselben Bedingungen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Verozell-Zytotoxizitäts-Tests mit einem Plattenphotometer durch Differenzmessung der Testwellenlänge OD<sub>540</sub> und der Referenzwellenlänge OD<sub>690</sub> (OD = OD<sub>540</sub> - OD<sub>690</sub>). Die absolute optische Dichte (OD<sub>abs</sub>) der Proben und Kontrollen erfolgte durch die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes der Ansätze:

$$OD_{abs} = [OD_{Ansatz\ 1} + OD_{Ansatz\ 2} + OD_{Ansatz\ 3}] / 3$$

Die Stoffwechselaktivität der untersuchten Verozellen wurde anhand der Positiv- (OD<sub>pos</sub>) und Negativ-Kontrolle (OD<sub>neg</sub>) in der jeweiligen Mikrotiterplatte standardisiert. Die Formel zur Ermittlung der relativen optischen Dichte lautete:

$$OD_{rel} \text{ (in \%)} = [(OD_{abs} - OD_{pos}) / (OD_{abs} - OD_{neg})] \times 100$$

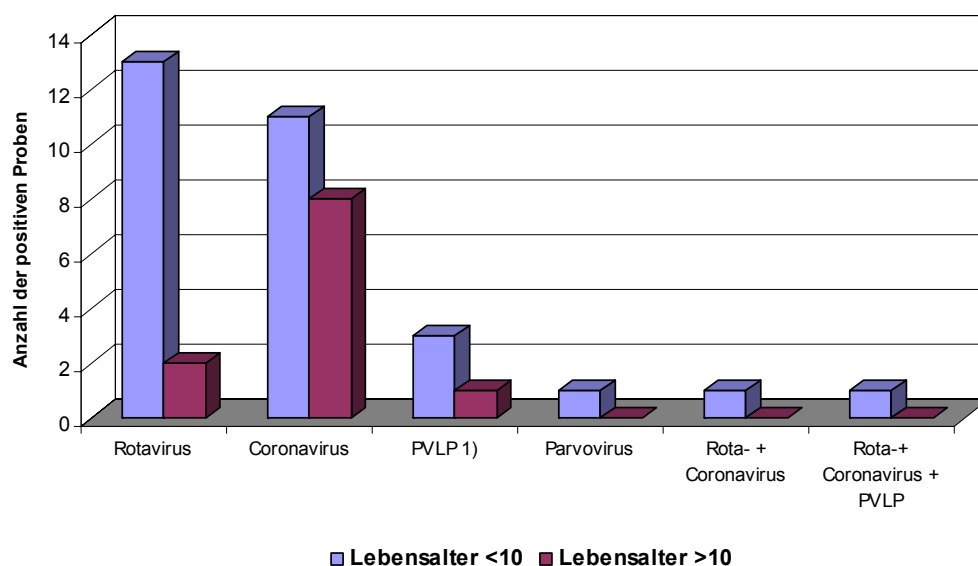
## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Kotproben auf Viren

Viren wurden in 40 der 93 untersuchten Kälberkotproben (43,0 %) nachgewiesen. Dabei handelte es sich in 15 Fällen (37,5 %) um Rotavirus und 19 Fällen (47,5 %) um Coronavirus. Rota- und Coronavirus fanden sich gleichzeitig nur bei einem Kalb (2,5 %), ebenso war nur eine Kotprobe Parvovirus-positiv. Picornavirus-ähnliche Partikel (PVLP) waren allein in 3 Proben (7,5 %) nachzuweisen, eine weitere Kotprobe wies neben PVLP zugleich Rota- und Coronavirus auf (**Abb.1**).

Unter Berücksichtigung des Lebensalters der Virus-positiven Kälber (< 10 Tage/ > 10 Tage) waren 15 der Kälber mit Rotavirus-Nachweis (incl. der 2 Proben mit Coronavirushnachweis) unter 10 Tage und 2 über 10 Tage alt (**Tab: 7**).

Die 21 Coronavirus-haltigen Proben (incl. 2 Proben mit Rotavirushnachweis) verteilten sich auf 13 Kälber, die jünger als 10 Tage und 8 Kälber die älter als 10 Tage waren.



**Abbildung 1: Elektronenmikroskopischer Nachweis von enteropathogenen Viren in Kotproben von Kälbern mit Diarrhö (n = 93) in Abhängigkeit vom Lebensalter**

**Erläuterung: 1) PVLP = Picornavirus-ähnliche Partikel**



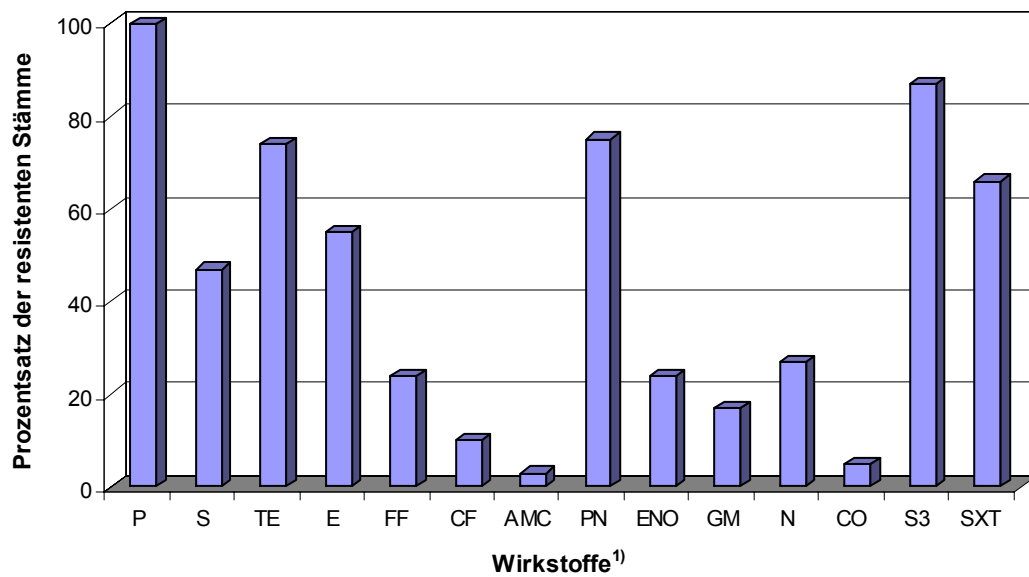
**Tabelle 7: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Rota- und Coronaviren in Kotproben durchfallkranker Kälber**

Alter der Kälber	n	Zahl der positiven Kotproben (%)	
		Rotavirus	Coronavirus
< 10 Tage	61	15(25 %)	13(21,3 %)
> 10 Tage	32	2(6,25 %)	8(25 %)
Gesamt	93	17	21

**Erläuterung:** n = Anzahl der Kälber

### 3.2.2 Bakteriologische Untersuchung der Kotproben

In allen 95 untersuchten Kotproben wurden im Rahmen der bakteriologischen Untersuchungen *E.coli*-Bakterien nachgewiesen. Von den insgesamt 100 Isolaten wiesen 7 auf Blutagar  $\alpha$ -Hämolysin-Bildung auf. Die Ansätze auf *Salmonellen* verliefen durchweg negativ und *C. perfringens* fanden sich in 42 der 95 Proben (44,2 %) in wechselndem Keimgehalt. Die isolierten *E.coli*-Bakterien wurden im Agardiffusionstest gegenüber 14 verschiedenen Chemotherapeutika getestet und zeigten hier in hohem Maße wechselnde Resistenzraten (**Abb. 2**). So bestand eine vollständige Resistenz gegenüber Penicillin G, gegenüber Sulfonamiden, Ampicillin und Tetracyclin lagen die Resistenzraten bei 87 %, 75 % bzw. 74 % und hinsichtlich Trimethoprim/Sulfamethoxazol erwiesen sich 66 % der Isolate als unempfindlich. Es folgten Erythromycin und Streptomycin mit 55 % bzw. 47 % und in einem größeren Abstand Neomycin, Florfenicol, Enrofloxacin und Gentamycin mit Resistenzraten der Isolate um 20 % (17-27 %). Gegenüber Ceftiofur, Colistin und Amoxycillin/Clavulansäure wiesen die Isolate mit 10 %, 5 % bzw. 3 % im Vergleich nur eine geringe Resistenzhäufigkeit auf. Die 100 in den Resistenztests geprüften *E.coli*-Isolate wurden zur näheren Charakterisierung auf phänotypischer und molekularbiologischer Ebene weiter bearbeitet.



**Abbildung 2: Ergebnisse der Untersuchung auf Antibiotikaresistenz bei 100 *E.coli*-Stämmen aus Kotproben von Kälbern mit Diarrhö**

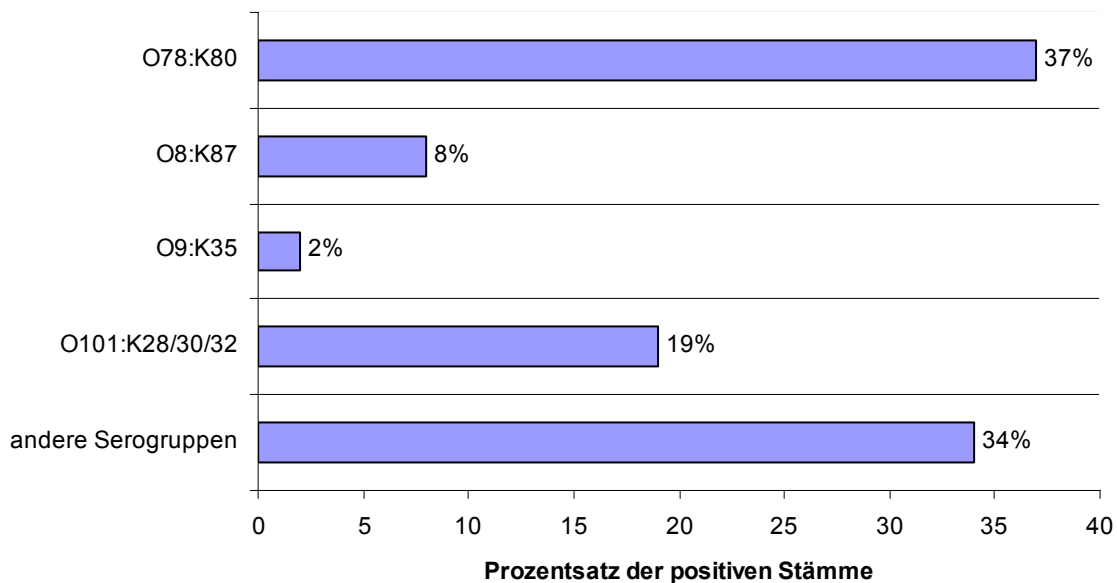
**Erläuterung:** 1) **P** = Penicillin; **S** = Streptomycin; **TE** = Tetracyclin; **E** = Erythromycin; **FF** = Florfenicol; **CF** = Ceftiofur; **AMC** = Amoxycillin/Clavulansäure; **PN** = Ampicillin; **ENO** = Enrofloxacin; **GM** = Gentamycin; **N** = Neomycin; **CO** = Colistin; **S3** = Sulfonamide; **SXT** = Sulfamethoxazol/Trimethoprim

### 3.2.3 Phänotypische Charakterisierung

Die phänotypische Charakterisierung erstreckte sich auf die Serotypisierung mittels Objektträgerschnellagglutination mit 4 verschiedenen OK-Seren, die Untersuchung der Mannose-resistenten Hämagglutination gegenüber Erythrozyten von 5 verschiedenen Tierspezies sowie auf das Verhalten der *E.coli*-Stämme im Serumresistenztest.

#### 3.2.3.1 Serotypisierung

Die 100 *E.coli*-Stämme reagierten in der Objektträger-Schnellagglutination in 37 Fällen mit der Serogruppe O78:K80. Die 63 verbleibenden Isolate wurden mit drei weiteren O-Antiseren ausgetestet. Dabei reagierten 29 *E.coli*-Isolate mit einem der eingesetzten Seren. Hierbei handelte es sich um die Gruppen O8:K87 (8 %), O9:K35 (2 %) und O101:K28/30/32 (19 %). Insgesamt 34 Feldisolate ließen sich mit Hilfe der vier eingesetzten Antiseren nicht typisieren (**Abb. 3**).



**Abbildung 3: Ergebnisse der Serotypisierung von *Escherichia coli*-Stämmen (n = 100) aus 95 Kotproben von Kälbern mit Durchfall**

### 3.2.3.2 Mannoseresistente Hämagglutination (MRHA)

Von den 100 *E.coli*-Isolaten hämagglutinierten 42 Stämme mit einer oder mehreren der getesteten Erythrozytenarten, ohne dass die Agglutination durch Mannose gehemmt wurde. Unter Berücksichtigung der Herkunft der verschiedenen Erythrozyten ergab sich für die MRHA-resistenten *E.coli*-Isolate eine Einteilung in 16 verschiedene HA-Muster (**Tab. 8**). Von den 42 auf diese 16 Muster verteilten Isolate entfielen insgesamt 7 bzw. 6 auf die Muster 1 und 3, gefolgt von je 4 Isolate in den Mustern 10, 11 und 15. Dies entspricht einem Anteil von 25 Stämmen (59,5 %) an 5 der 16 HA-Muster.

Der Anteil der verschiedenen Erythrozyten an den 16 MRHA-Mustern ist **Tab. 9** zu entnehmen. Danach wurden Schaferythrozyten von 33 (78,6 %) der 42 MRHA-positiven Stämme agglutiniert, während Rindererythrozyten mit 28 (66,7 %) der 42 Isolate reagierten. Es folgten 25 Stämme, die mit Meerschweinchen-Erythrozyten, sowie 19 und 15 Stämme, die mit Pferde- bzw. Hühnererythrozyten reagierten.

**Tabelle 8: Hämagglutinationsmuster (HA-Muster) bei 42 MRHA-positiven *E.coli*-Stämmen aus Kotproben durchfallkranker Kälber**

HA-Muster	Ergebnisse der Hämagglutination mit Erythrozyten von					Zahl der Stämme
	Rind	Schaf	Pferd	Meerschweinchen	Huhn	
1	+	+	+	+	+	7
2	+	+	+	+	-	2
3	+	+	-	+	+	6
4	-	+	+	+	-	1
5	+	-	+	+	-	2
6	-	-	+	+	+	1
7	+	+	-	+	-	1
8	+	+	+	-	-	1
9	-	+	-	+	+	1
10	+	+	-	-	-	4
11	-	+	+	-	-	4
12	-	+	-	+	-	2
13	+	-	-	+	-	2
14	+	-	-	-	-	3
15	-	+	-	-	-	4
16	-	-	+	-	-	1

42

**Erläuterung:** + = deutliche, mit bloßen Auge wahrnehmbare Agglutination, - = negativ

**Tabelle 9: Anteil der aus Kälberkotproben isolierten *E.coli*-Stämmen an der MRHA mit verschiedenen Erythrozyten**

Herkunft der Erythrozyten	Zahl der MRHA positiven Stämme (%)	
	n	%
Rind	28	(66,7)
Schaf	33	(78,6)
Pferd	19	(45,2)
Meerschweinchen	25	(59,6)
Huhn	15	(35,8)

### 3.2.3.3 Serumresistenztest

Die Fähigkeit von *E.coli*-Bakterien, sich unter Einwirkung von Kolostrum-freiem Kälberserum vermehren zu können (Serumresistenz), wird als Hinweis auf deren Virulenzpotential für septikämische Infektionen in Kälbern gewertet. Von den 100 hier untersuchten Isolaten erwiesen sich 54 in diesem Test als resistent und 35 als sensitiv. Die 11 übrigen Stämme zeigten ein intermediäres Verhalten (**Tab. 10**).

Bei Berücksichtigung der Ergebnisse der Serotypisierung erwiesen sich 7 von 8 O8:K87-Stämmen, 19 von 37 O78:K80-Stämmen und 10 von 19 O101:K28/30/32-Stämmen als serumresistent. Unter den 34 Isolaten anderer Serogruppen lag diese Zahl bei 18.

**Tabelle 10: Ergebnisse des Serumresistenztestes von 100 *E.coli*-Isolaten aus Kälbern mit Diarrhö**

Serogruppen	Anzahl untersuchter Isolate	Zahl der Isolate		
		Resistent	Sensitiv	Intermediär
O8:K87	8	7	1	-
O9:K35	2	-	2	-
O78:K80	37	19	11	7
O101:K28/30/32	19	10	9	-
„andere“	34	18	12	4
Insgesamt	100	54	35	11

**Erläuterung:** - = negativ

### 3.2.4 Molekularbiologische Charakterisierung

Das Vorkommen und die Ausstattung der *E.coli*-Feldisolate mit Genen, welche Eigenschaften wie Adhäsionsvermögen, Toxizität oder Invasivität dieser Bakterien kodieren und damit als Bewertungsgrundlage des "Virulenzpotentials" eines Isolates geeignet sind, wurde mit Hilfe der PCR molekulargenetisch bestimmt. Auf der Basis dieser Resultate wurden die *E.coli*-Stämme, soweit möglich, den verschiedenen heute beschriebenen *E.coli*-Pathovaren zugeordnet. Zur Erfassung eventuell vorhandener Unterschiede in der Ausstattung mit Virulenzgenen erfolgte in einer alternativen Gegenüberstellung die Aufteilung der 100 Stämme in zwei Untersuchungsgruppen, von denen Gruppe I die 37 O78:K80-Isolate enthielt, während Gruppe II die anderen 63 Isolate diverser Serogruppen zusammenfasste.

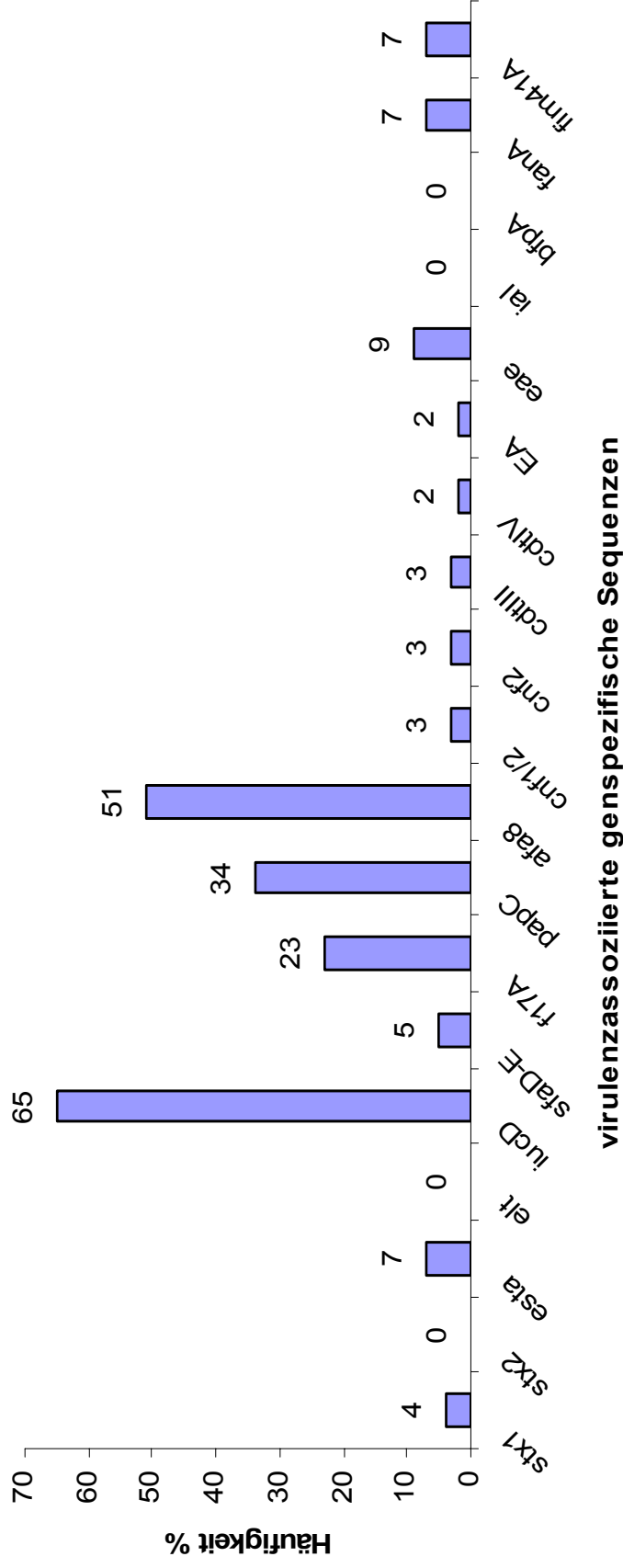
#### 3.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die summierten Ergebnisse der an den 100 Isolaten durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen auf das Vorkommen von 19 verschiedenen Virulenz-assoziierten genspezifischen Sequenzen (s. unter 3.1.3.8., Tab. 4-6) sind der **Abb. 4** zu entnehmen. Danach konnten die genspezifischen Sequenzen für *elt* (hitze labiles Enterotoxin), *stx2* (Shigatoxin Typ 2), *ial* (*Shigella flexneri* Invasion Plasmid) sowie *bfpA* (Bundle forming pili) in keinem der 100 Isolate nachgewiesen werden. Am häufigsten gelang der Nachweis von *iucD* (Aerobaktin) mit 65 %, gefolgt von den Adhäsionsfaktoren determinierenden genspezifischen Sequenzen *afa8* (51 %), *papC* (34 %), *f17A* (23 %) sowie, mit größerem Abstand *sfaD-E* (5 %). Positive Reaktionen für das *eae*-Gen (Intimin) und das *stx1*-Gen (Shigatoxin Typ 1) fanden sich bei 9 bzw. 4 *E.coli*-Stämmen, während *esta* (hitze stabiles Enterotoxin) sowie *fanA* (F5-Fimbrien) und *fim41A* (F41-Fimbrien) gleichermaßen in 7 *E.coli*-Stämmen enthalten waren. Sequenzen der weiteren Virulenzgene (*cnf1/2*, *cnf2*-Zytonekrosefaktor 1/2 bzw. 2; *cdtIII*, *cdtIV*-Cytolethal Distending Toxin Typ III bzw. IV; *EA*-Plasmid enteroaggregativer *E.coli*) waren jeweils nur in 2-3 *E.coli*-Stämmen nachzuweisen.

Bei Aufteilung der *E.coli*-Stämme in die Gruppen I (Serogruppe O78:K80) und II (diverse Serogruppen) ergaben sich die in **Abb. 5** und **6** zusammengestellten prozentualen Verteilungen Virulenz-assoziiierter genspezifischer Sequenzen, bzw. *E.coli*-Stämme. In Gruppe I dominierten Stämme mit *iucD* und/oder mit *afa8* (jeweils 17= 45,9 %). Die Zahl der Isolate mit *papC* sowie mit *f17A* lag bei 11 (29,8 %) bzw. 10 (27,0 %). Vier Stämme (10,9 %) trugen das *sfaD-E* und vereinzelt gelang der Nachweis von *cnf1/2*, *cnf2*, *cdtIII* und/oder *cdtIV* (1-3 *E.coli*-Stämme).

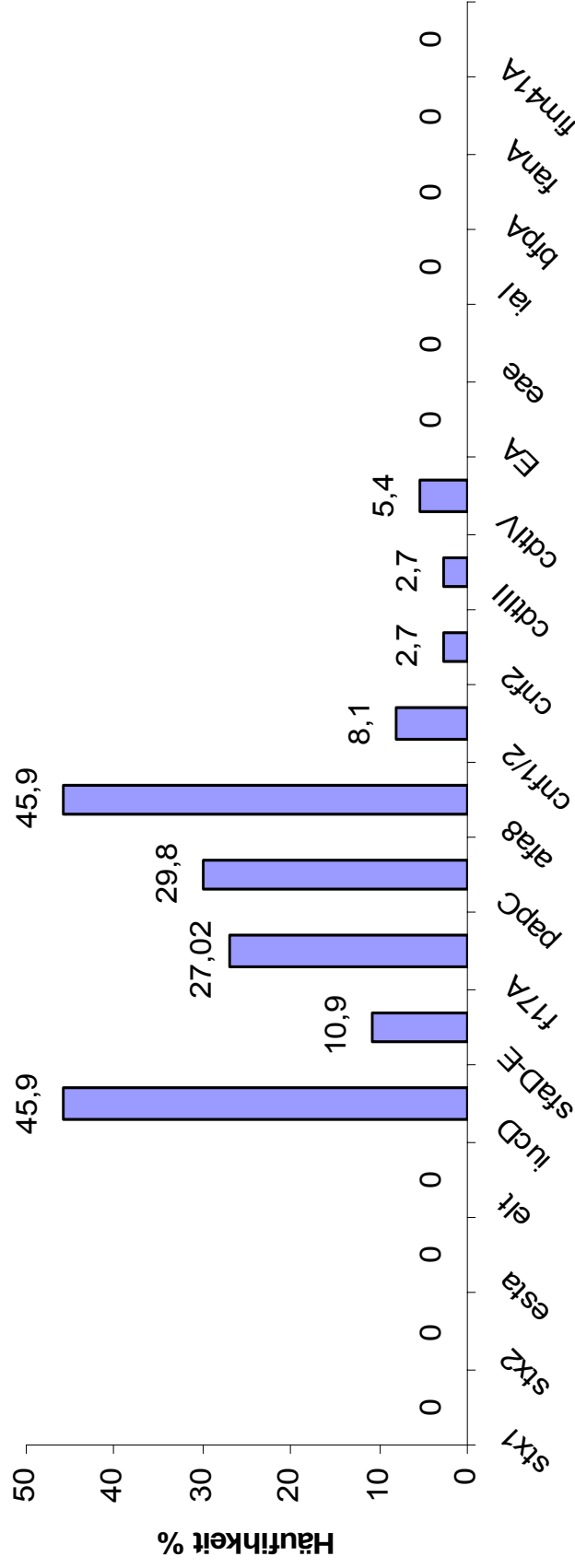


In Gruppe II waren es ebenfalls das *iucD* und das *afa8*, die am häufigsten nachgewiesen wurden (n = 48 [76,1 %] bzw. n = 33 [52,3 %]), ebenfalls gefolgt von 23 Isolaten (36,5 %) mit *papC*- und 13 Isolaten mit *f17A*-Gennachweis. Während die Zahl der Nachweise von *sfaD-E*, *cnf2*, *cdtIII* und *EA* geringer war (1-2 Stämme), fanden sich hier 9 Isolate (14,2 %) mit positiver Reaktion beim *eae*-Gen und 4 beim *stx1*-Gen (6,3 %). Sieben Isolate (11,1 %) waren positiv in Hinblick auf *fanA*, *fim41A* und *esta*.



**Abbildung 4: Nachweise virulenzassoziiierter genspezifischer Sequenzen mittels PCR in *E. coli*-Isolaten von Kälbern mit Diarrhö (n = 100)**  
**Erläuterung:** *stx1* = Shigatoxin Typ 1; *stx2* = Shigatoxin Typ 2; *estA* = Hitzestabiles Enterotoxin ST-I; *elt* = Hitzelabiles Enterotoxin LT-I; *iucD* =

Eisenaufnahmesystem; *sfaD-E* = Adhäsionsfaktor-S-Fimbrien; *f17A* = Adhäsionsfaktor-F17-Fimbrien; *papC* = Adhäsionsfaktor Fimbrien; *afa8* = Afimbrial adhäsion Faktor Afa8; *cnf1/2* = Zytotoxisch nekrotisierender Faktor Typ 1 und Typ 2; *cnf2* = Zytotoxisch nekrotisierender Faktor Typ 2; *cdtIII* = Cytolethal Distending Toxin Typ III; *cdtIV* = Cytolethal Distending Toxin Typ IV; *EA* = Plasmid enteroaggregativer *E. coli*; *eae* = Intimin; *ial* = *Shigella flexneri* Invasion Plasmid; *bfpA* = Adhäsionsfaktor „Bundle forming pilli“; *fanA* = Fimbrien 5 (F5); *fim41A* = Fimbrien 41 (F41)



### virulenzassoziierte genspezifische Sequenzen

**Abbildung 5: Nachweise virulenzassoziiierter genspezifischer Sequenzen mittels PCR in *E.coli*-Isolaten der Serogruppe O78 (n = 37) von Kälbern mit Diarrhö**  
**Erläuterung:** *stx1* = Shigatoxin Typ 1; *stx2* = Shigatoxin Typ 2; *estA* = Hitzestabiles Enterotoxin ST-I; *elt* = Hitzelabiles Enterotoxin LT-I; *iucD* = Eisenaufnahmesystem; *sfaD-E* = Adhäsionsfaktor-S-Fimbrien; *f17A* = Adhäsionsfaktor-F17-Fimbrien; *papC* = Adhäsionsfaktor-P-Fimbrien; *afa8* = Afimbrial adhesion Faktor Afa8; *cnf1/2* = Zytotoxisch nekrotisierender Faktor Typ 1 und Typ 2; *cnf2* = Zytotoxisch nekrotisierender Faktor Typ 2; *cdtIII* = Cytolethal Distending Toxin Typ III; *cdtIV* = Cytolethal Distending Toxin Typ IV; *EA* = Plasmid enteroaggregativer *E.coli*; *eae* = Intimin; *ial* = *Shigella flexneri* Invasion Plasmid; *bfpA*= Adhäsionsfaktor „Bundle forming pili“; *fanA* = Fimbrien 5 (F5); *fim41A* = Fimbrien 41 (F41)



**Erläuterung: *stx1* = Shigatoxin Typ 1; s**

53

Hierbei ist zu berücksichtigen, dass diese Auflistungen (Abb. 4-6) ein schiefes Bild ergeben, da besonders bei den die Adhäsionsfaktoren kodierenden Genen vielfach mehrere Gene gleichzeitig nachgewiesen wurden (**Tab. 11**). So waren bei 17 der 100 *E.coli*-Isolate überhaupt keine der hier getesteten Adhäsionsgene auszumachen. Von den verbleibenden 83 Stämmen wiesen 43 nur jeweils eine entsprechende Sequenz auf, am häufigsten *afa8* (20), gefolgt von *eae* (9), *f17A* (7) und *papC* (6). Die meisten Kombinationen waren *afa8/papC* (14), *afa8/papC/f17A* (9) und *fanA/fim41A* (6).

**Tabelle 11: Verteilungsmuster der für die verschiedenen Adhäsionsfaktoren spezifischen Gensequenzen bei *E.coli*-Stämmen aus Kotproben von Kälbern**

Adhäsionsfaktoren <sup>1)</sup>	Zahl der positiven Isolate							Gesamt
	<i>afa8</i>	<i>f17A</i>	<i>papC</i>	<i>sfaD-E</i>	<i>fanA</i>	<i>fim41A</i>	<i>eae</i>	
	20	7	6	1	-	-	9	43
<i>afa8/papC</i>	14	-	14	-	-	-	-	14
<i>afa8/f17A</i>	3	3	-	-	-	-	-	3
<i>afa8/sfaD-E</i>	2	-	-	2	-	-	-	2
<i>afa8/papC/f17A</i>	9	9	9	-	-	-	-	9
<i>afa8/papC/sfaD-E</i>	1	-	1	1	-	-	-	1
<i>afa8/papC/sfaD-E/f17A</i>	1	1	1	1	-	-	-	1
<i>fanA/fim41A/afa8</i>	1	-	-	-	1	1	-	1
<i>papC/f17A</i>	-	3	3	-	-	-	-	3
<i>fanA/fim41A</i>	-	-	-	-	6	6	-	6
Gesamt	51	23	34	5	7	7	9	83

**Erläuterung:** 1) *afa8* = Afimbrial adhäsion Faktor *afa8*; *f17A* = Adhäsionsfaktor-F17-Fimbrien; *papC* = Adhäsionsfaktor-P-Fimbrien; *sfaD-E* = Adhäsionsfaktor-S-Fimbrien; *fanA* = Fimbrien 5 (F5); *fim41A* = Fimbrien 41 (F41); *eae* = Intimin; - = negativ

### 3.2.4.2 Einteilung der *E.coli*-Isolate in Pathovare

Auf der Basis der PCR-Ergebnisse erfolgte die Zuordnung der *E.coli*-Stämme zu den verschiedenen heute bekannten *E.coli*-Pathovaren (**Tab. 12**). Das war bei 70 der 100 Stämme möglich. Von diesen wurden 46 aufgrund ihrer Virulenzgenausstattung (*afa8*, *f17A*, *papC*, und/oder *sfaD-E* sowie *iucD*) als ExPEC und 6 weitere als NTEC (*cnf1/2*, *cnf2*, *cdtIII* und /oder *cdtIV*) erfasst. Als ETEC erwiesen sich 7 Stämme mit *fanA*, *fim41A* (F5, F41) und *estA*-positivem (hitzestabiles Enterotoxin ST) PCR-Ergebnis, und von den 9 *eae*-positiven Stämmen wurden 5 als EPEC und 4 als EHEC (*eae* und *stx1*) erkannt. Zwei Stämme mit *EA*-Gensequenzen wurden den EAEC zugeordnet. Während von den verbleibenden 30 Isolaten 13 mit keinen der hier erfassten Virulenzgene ausgestattet waren, konnten bei den restlichen 17 Stämmen zwar (z.T. mehrere) Gene für Adhäsionsfaktoren oder nur Aerobaktin (*iucD*) nachgewiesen werden, für eine weitergehende Einteilung reichte dies jedoch nicht aus.

Ergänzend ist anzumerken, dass *iucD* außer bei den ExPEC-Isolaten und 2 der 17 Stämme mit fraglicher Zugehörigkeit auch bei allen 4 EHEC, 2 der 7 ETEC, 4 der 6 NTEC und den 2 EAEC nachgewiesen wurde. Von den 7  $\alpha$ -Hämolysin-bildenden *E.coli* verteilten sich 3 auf die NTEC, je einer auf die ExPEC und die Virulenzgen-negativen Stämme und die restlichen 2 auf die Stämme mit fraglicher Zugehörigkeit.

### 3.2.4.3 *E.coli*-Pathovare und Alter der Kälber

Die Verteilung der *E.coli*-Pathovare auf die beiden Altersgruppen ist **Abb.7** zu entnehmen. Während ExPEC und ETEC häufiger bei Kälbern  $\leq 10$  Tage nachgewiesen wurden (59,9 % versus 27,3 % bzw. 9,7 % versus 3,0 %), überwogen EPEC bei den über 10 Tage alten Kälbern leicht (4,8 % zu 6,1 %) und EHEC sowie NTEC deutlich (1,6 % zu 9,1 % bzw. 3,2 % zu 12,1 %).

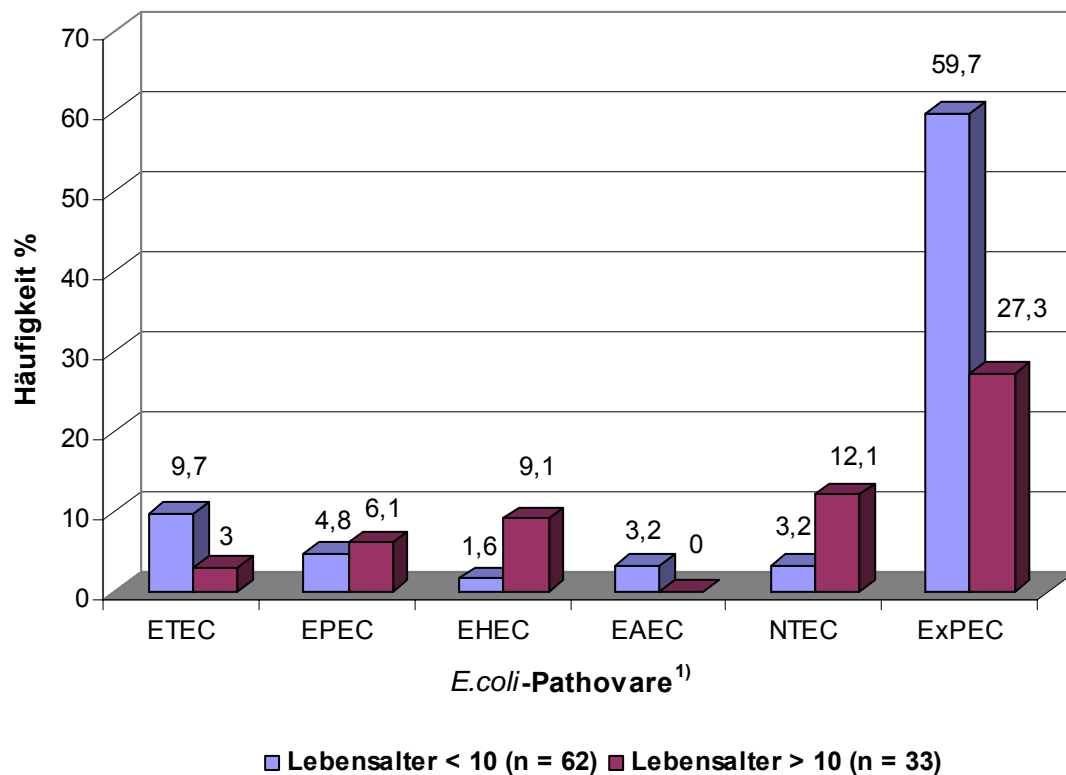
### 3.2.4.4 *E.coli*-Pathovare und Serogruppen

Die Beziehung zwischen den *E.coli*-Pathovaren und den verschiedenen Serogruppen zeigt **Tab. 13**. Während ETEC überwiegend der O101-Gruppe angehörten, mussten EPEC und EHEC fast alle der Gruppe der hier Nicht-Typisierbaren („Andere“ Serogruppen) zugeschlagen werden. Vier der 6 NTEC erwiesen sich als O78:K80 und die 46 ExPEC-Stämmen verteilten sich auf O78:K80 (13), O8:K87 (5), O9:K35 (1), O101:K28/30/32 (10) sowie „Andere“ Serogruppen (17).

**Tabelle 12: Nachweis unterschiedlicher Pathovare bei 100 *E.coli*-Isolaten aus Kotproben durchfallkranker Kälber**

Pathovare <sup>1)</sup>	Virulenzfaktoren <sup>2)</sup>	Zahl der positiven Stämme (PCR)
EPEC	<i>eae</i>	5
EHEC	<i>stx1, eae</i>	4
ETEC	<i>esta, fanA, fim41A</i>	7
EAEC	<i>EA</i>	2
NTEC	<i>cnf2, cnf1/2, cdtIII, cdtIV</i>	6
ExPEC	<i>sfaD-E, afa8, f17A, papC, iucD</i>	46
???	<i>sfaD-E, afa8, f17A, papC</i> <b>oder</b> <i>iucD</i>	17
-	Ohne Virulenzfaktoren	13

**Erläuterungen:**     **1) EPEC** = Enteropathogene *E.coli*; **EHEC** = Enterohämorrhagische *E.coli*; **ETEC** = Enterotoxische *E.coli*; **EAEC** = Enteroaggregative *E.coli*; **NTEC** = Nekrotoxische *E.coli*; **ExPEC** = Extraintestinale pathogene *E.coli*; **???** = Keine Klare Pathovar-Zuordnung möglich; - = negativ  
**2) s. Abb. 4**



**Abbildung 7: Korrelationen zwischen dem Vorkommen von *E. coli*-Pathovaren in Kotproben und dem Alter der durchfallkranken Kälber**

**Erläuterungen:** 1) **EPEC** = Enteropathogene *E. coli*; **EHEC** = Enterohämorrhagische *E. coli*; **ETEC** = Enterotoxische *E. coli*; **EAEC** = Enteroaggregative *E. coli*; **NTEC** = Nekrotoxische *E. coli*; **ExPEC** = Extraintestinale pathogene *E. coli*.



**Tabelle 13: Verteilung der *E.coli*-Pathovaren<sup>1)</sup> auf die verschiedenen Serogruppen**  
Anzahl der positiven Stämme bei Pathovaren (PCR)

Serogruppe	ETEC	EPEC	EHEC	EAEC	NTEC	ExPEC
O78:K80	-	-	-	-	4	13
O8:K87	1	-	1	-	-	5
O9:K35	1	-	-	-	-	1
O101:K28/30/32	4	-	-	1	-	10
„andere“	1	5	3	1	2	17
Gesamt	7	5	4	2	6	46

**Erläuterungen:** **EPEC** = Enteropathogene *E.coli*; **EHEC** = Enterohämorrhagische *E.coli*; **ETEC** = Enterotoxische *E.coli*; **EAEC** = Enteroaggregative *E.coli*; **NTEC** = Nekrotoxische *E.coli*; **ExPEC** = Extraintestinale pathogene *E.coli*; - = negativ

### 3.2.4.5 Weitere Gegenüberstellungen geno- und phänotypischer Ergebnisse

#### *E.coli*-Virulenzgene, Serogruppen und Serumresistenz

Das Vorkommen der im Serumresistenztest als positiv (= resistent) ermittelten *E.coli*-Stämme und ihre Verteilung auf die verschiedenen *E.coli*-Sero- und Pathovare geht aus **Tab. 14** hervor. Sie zeigt, dass im Durchschnitt jeweils die Hälfte der unterschiedlichen *E.coli*-Pathovare sich als serumresistent erwiesen hatten. Schwerpunktbildungen ergaben sich, auch unter Berücksichtigung der verschiedenen Serogruppen nicht. Eine gewisse Häufung deutete sich bei *E.coli* O8:K87 an, soweit sie den ExPEC zuzuordnen waren. Gleichmaßen lag die Zahl der Isolate mit Serumresistenz in den Gruppen der Pathovar-fraglichen *E.coli* und der Stämme ohne Virulenzgen bei ca. der Hälfte bzw. über der Hälfte der Gesamtzahlen dieser Gruppen.

**Tabelle 14: Verteilung der im Serumresistenztest positiven *E.coli* auf die verschiedenen Serogruppen und Pathovare**

<i>E.coli</i> - Pathovare	Anzahl der positiven Stämme bei verschiedenen Serogruppen					Gesamt
	O8:K87	O9:K35	O78:K80	O101:K28/30/32	„andere“	
ETEC	1/1	0/1	-	3/4	0/1	4/7
EPEC	-	-	-	-	2/5	2/5
EHEC	1/1	-	-	-	1/3	2/4
EAEC	-	-	-	1/1	1/1	2/2
NTEC	-	-	2/4	-	2/2	4/6
ExPEC	4/5	0/1	6/13	5/10	8/17	23/46
???	1/1	-	5/11	0/2	2/3	8/17
Ohne Virulenzfaktoren	-	-	6/9	1/2	1/2	8/13
Gesamt	7/8*	0/2	19/37	10/19	17/34	53/100

**Erläuterung:** ??? = Keine klare Pathovar-Zuordnung möglich; \* = Serumresistenztest-positive Stämme/Gesamtzahl; - = negativ

### ***E.coli*-Pathovare und Rota- sowie Coronavirus-Nachweise**

Die aus Proben, in denen elektronenmikroskopisch Rota- oder Coronaviren nachgewiesen wurden, isolierten und charakterisierten *E.coli*-Isolate sind in **Tab. 15** einander gegenübergestellt worden. Dabei war eine Häufung bestimmter Pathovare bei beiden Virusgruppen nur im Bezug auf ExPEC (10 bzw. 14 Virus-Nachweise) zu beobachten. Rotavirusnachweise standen zweimal in Zusammenhang mit der Isolierung von ETEC.

**Tabelle 15: Nachweise von Rota- und Coronaviren in Kotproben durchfallkranker Kälber mit nachgewiesenen *E.coli*-Pathovaren**

<i>E.coli</i> -Pathovare	Anzahl der Stämme	Anzahl der positiven Isolate (ELMI)	
		Rotavirus	Coronavirus
ETEC	7	2	-
EPEC	5	1	1
EHEC	4	-	1
EAEC	2	1	-
NTEC	6	-	1
ExPEC	46	10	14
???	17	2	2
Ohne Virulenzfaktoren	13	1	2
Gesamt	100	17	21

**Erläuterung:** ??? = Keine klare Pathovar-Zuordnung möglich; - = negativ

### ***E.coli*-Serogruppen und MRHA-Muster**

**Tabelle 16** ist zu entnehmen, wie sich die *E.coli*-Isolate mit den verschiedenen MRHA-Eigenschaften (16 Muster) in Bezug auf ihre Serogruppenzugehörigkeit verteilten. Die insgesamt 42 Isolate mit Mannose-resistenter Hämagglutination ließen dabei in Abhängigkeit von ihrer Sero-var-Zugehörigkeit keine Häufung erkennen, sondern wiesen alle ein breites Verteilungsmuster auf.

Um zu erkennen, inwieweit innerhalb der 16 MRHA-Muster die einzelnen Erythrozyten-Arten agglutiniert wurden, erfolgte eine Auswertung auf der Basis, wie häufig die Isolate der einzelnen Serogruppen bzw. der Sammelgruppe mit den einzelnen Erythrozyten Mannose-resistent reagierten (**Tab. 17**). Danach waren es stets die Schaferythrozyten, dicht gefolgt von den Rinder- und den Meerschweinchen-Erythrozyten, die am häufigsten Mannose-resistent agglutinierten. Allerdings ist auch zu berücksichtigen, dass in den Gruppen O78:K80, O101:K28/30/32 und der Sammelgruppe mit  $n = 22$ ,  $n = 11$  und  $n = 21$  die Zahlen der Isolate, die überhaupt keine MRHA aufwiesen, höher waren als die mit MRHA ( $n = 15$ ,  $n = 8$  bzw.  $n = 13$ ).

**Tabelle 16: Überblick über die Korrelation zwischen MRHA-Muster und Serogruppe bei 42 *E.coli*-Stämme**

MRHA-Muster	n	Zahl der positiven Stämme bei Serogruppen				
		O8:K87	O9:K35	O78:K80	O101:K28/30/32	„andere“
1	7	-	-	3	3	1
2	2	-	-	1	1	-
3	6	1	-	1	-	4
4	1	-	1	-	-	-
5	2	1	-	-	1	-
6	1	-	-	-	-	1
7	1	1	-	-	-	-
8	1	-	-	1	-	-
9	1	-	-	1	-	-
10	4	1	-	2	-	1
11	4	1	-	-	2	1
12	2	-	-	1	-	1
13	2	-	-	1	1	-
14	3	-	-	2	-	1
15	4	-	-	2	-	2
16	1	-	-	-	-	1
Gesamt	42	5	1	15	8	13

**Erläuterung:** MRHA = Mannose-resistente Hämagglutination; - = negativ; n = Anzahl der Stämme

**Tabelle 17: Überblick über die Korrelation zwischen Serogruppe und der an der MRHA beteiligten Erythrozytenart bei 42 *E.coli*-Stämmen**

Serogruppe	n	Zahl der positiven Stämme bei MRHA				
		Rd	Schf	Pfd	MS	Hh
O8:K87	5	4	4	2	3	1
O9:K35	1	-	1	1	1	-
O78:K80	15	11	12	5	8	5
O101:K28/30/32	8	6	6	7	6	3
„andere“	13	7	10	4	7	6
Gesamt	42	28	33	19	25	15

**Erläuterungen:** **MRHA** = Mannose resistente Hämagglutination; **Rd** = Rindererythrozyten; **Schf** = Schaferythrozyten; **Pfd** = Pferderythrozyten; **MS** = Meerschweinchen-Erythrozyten; **Hh** = Hühnererythrozyten; **n** = Anzahl der Stämme; - = negativ

***E.coli*-MRHA-Muster und Adhäsionsfaktor-kodierende Genausstattung**

Ein Vergleich der PCR-Ergebnisse für die verschiedenen Adhäsionsgene und Gen-Kombinationen mit der Fähigkeit der *E.coli*-Stämme zur Mannose-resistenten Hämagglutination ist in **Tab. 18** vorgenommen worden. Sie zeigt, dass die 42 MRHA-positiven *E.coli*, die bereits ein breites Spektrum an MRHA-Mustern abdecken, auch über eine Vielzahl an Adhäsion vermittelnden Genen und Gen-Kombinationen verfügen. Innerhalb der MRHA-positiven Isolate sind dabei keine Schwerpunkte zwischen MRHA-Muster und bestimmten genspezifischen Sequenzen auszumachen. Bei Vergleich mit den *E.coli*-Isolaten, die keine MRHA (MSHA) auslösten (n = 58), war zu erkennen, dass die Ausstattung der *E.coli*-Stämme mit genspezifische Sequenzen wie *afa8*, *eae*, *papC* sowie der Kombination *papC* + *afa8* fast überhaupt nicht oder nur selten mit der Eigenschaft zur MRHA korrelierte (*afa8*: nur 1 von 20 Stämmen, *eae*: nur 1 von 9 Stämmen, *papC*: 2 von 6 bzw. *papC* + *afa8*: 5 von 14 Stämmen). Demgegenüber waren 22 *E.coli*-Stämme mit *f17A*-Genausstattung allein oder in Kombination, sowie 7 mit *fanA/fim41A* (F5/F41)-Gensequenzen (mit 1 Ausnahme) immer auch in der Lage, MRHA (in verschiedenen Mustern) auszulösen (29 von 42 Isolaten). Drei von 17 *E.coli*-Stämmen ohne die hier erfassten Adhäsionsgene erwiesen sich ebenfalls als MRHA-positiv. Die auch hier wie ein Tab.17 durchgeführte Gegenüberstellung von Erythrozytenbeteiligung an der MRHA und der Ausstattung mit Adhäsionsgensequenzen der MRHA-positiven *E.coli*-Isolate (**Tab.19**) bestätigt die bereits zuvor konstatierte Häufung einer MRHA bei Schaf- und Rindererythrozyten, namentlich bei *E.coli*-Stämmen mit *f17A* Gensequenzen, einzeln oder in Kombination.

**Tabelle 18: Gegenüberstellung der die verschiedenen Adhäsionsfaktoren kodierenden Gensequenzen mit den 42 MRHA-Positiven und 58 MSHA E.coli-Isolaten**

MRHA-Muster	n	Zahl der Isolate mit Adhäsionsfaktoren														Zahl der Isolate Ohne Adhäsionsfaktoren			
		f17A	F5+ F41	sfa	papC	afa8	afa8+ f17A	papC +	afa8 afa8	+	sfa	papC f17A	+	papC f17A	papC+ afa8+ f17A+		sfa	papC+ afa8+ f17A+	F5+ F41+ afa8
1	7	2	-	-	-	-	1	2	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-
2	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	6	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	3	-	-	-	-	-
4	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
8	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	4	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-
11	4	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-
12	2	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
14	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-
15	4	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
16	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSHA	58	-	-	1	4	19	-	9	2	-	-	1	-	-	-	-	-	14	-



**Tabelle 19: Häufigkeit der an der MRHA beteiligten Erythrozyten in Beziehung zur Ausstattung der *E.coli*-Isolate mit Adhäsionssequenzen**

Adhäsionsfaktoren <sup>1)</sup>	n	Anzahl der Stämme mit positiven MRHA-Reaktionen bei verschiedenen Erythrozytenarten				
		Rind	Schaf	Pferd	Meerschweinchen	Huhn
<i>f17A</i>	7	6	7	4	5	4
<i>fanA</i> + <i>fim41A</i>	6	3	5	5	3	-
<i>sfaD-E</i>	1	-	-	-	-	-
<i>papC</i>	6	1	1	-	1	-
<i>afa8</i>	20	-	1	-	-	-
<i>afa8</i> + <i>f17A</i>	3	1	3	1	3	2
<i>papC</i> + <i>afa8</i>	14	3	4	3	3	2
<i>afa8</i> + <i>sfaD-E</i>	2	-	-	-	-	-
<i>papC</i> + <i>f17A</i>	3	3	1	1	3	1
<i>papC</i> + <i>afa8</i> + <i>f17A</i>	9	7	7	2	5	4
<i>papC</i> + <i>afa8</i> + <i>sfaD-E</i>	1	1	1	1	1	1
<i>papC</i> + <i>afa8</i> + <i>sfaD-E</i> + <i>f17A</i>	1	1	1	-	-	-
<i>fanA</i> + <i>fim41A</i> + <i>afa8</i>	1	-	1	1	-	-
<i>eae</i>	9	1	-	-	-	-
Ohne	17	1	1	1	1	1
Gesamt	100	28	33	19	25	15

**Erläuterungen:** MRHA = Mannose resistente Hämagglutination; MSHA = Mannose sensitive Hämagglutination; 1) = s. Tabelle. 11

#### 3.2.4.6 Zytotoxizitätsprüfung der *E.coli*-Isolate mit Verozellen

9 *E.coli*-Isolate erwiesen sich auf Verozellen als zytotoxisch. Mikroskopisch zeigte sich dies durch Zerstörung der Zellen, Auflösung der Zellgrenzen sowie Abrundung der Zellen. Im MTT-Test ließen die Zellen in allen 9 Fällen keine Stoffwechselaktivität mehr erkennen. Ihre Ausstattung mit Virulenzgenen ist **Tab. 20** zu entnehmen. Danach handelte es sich in 4 Fällen um EHEC, zweimal um ExPEC und je einmal um ETEC und NTEC. Ein weiterer positiver Stamm war keiner Pathovar sicher zuzuordnen. Zwei der 9 Stämme zeigten die Fähigkeit zur MRHA.

Neben der klassischen Zytotoxizität bei Verozellen durch *E.coli* waren in 12 weiteren Fällen mikroskopisch untypische morphologische Veränderungen an den Verozellen festzustellen. Diese nur durch Bakterienlysat reproduzierbar auszulösenden Alterationen waren durch eine Polarisierung oder ein Hervortreten der Zellgrenzen der eukaryotischen Zellen sowie ihre Verlängerung und Zusammenlagerung zu Strängen gekennzeichnet (**s. Abb. 8**). Im MTT-Test waren in diesen Fällen Abweichungen in der Stoffwechselaktivität nicht festzustellen.

Von den 12 *E.coli*-Stämmen mit den genannten Eigenschaften ließen sich 5 als ExPEC, 3 als NTEC und ein Stamm als EPEC einordnen (**Tab. 21**). Je 1 weiteres Isolat war von fraglicher Pathovarzugehörigkeit bzw. ohne eines der hier erfassten Virulenzgene. MRHA vermochten nur 3 der 11 Isolate auszulösen.

**Tabelle 20: Auflistung der Virulenzgen-Ausstattung und des MRHA-Vermögens von 9 verotoxigenen *E.coli*-Stämmen aus Kotproben durchfallkranker Kälber**

Virulenzgenmuster <sup>1)</sup>	Pathovare	n	Zahl der MRHA-positive Isolate
<i>fanA, fim41A, estA</i>	ETEC	1	1
<i>eae, stx1, iucD</i>	EHEC	4	-
<i>afa8, papC, iucD</i>	ExPEC	1	-
<i>papC, iucD</i>	ExPEC	1	-
<i>cnf2, cnf1/2, cdtIII, f17A, iucD</i>	NTEC	1	1
<i>iucD</i>	???	1	-
Gesamt		9	2

**Erläuterung:** MRHA = Mannose resistente Hämagglutination; - = negativ; n = Anzahl der Stämme; ??? = Keine klare Pathovar-Zuordnung möglich; 1) = s. **Abb. 4**

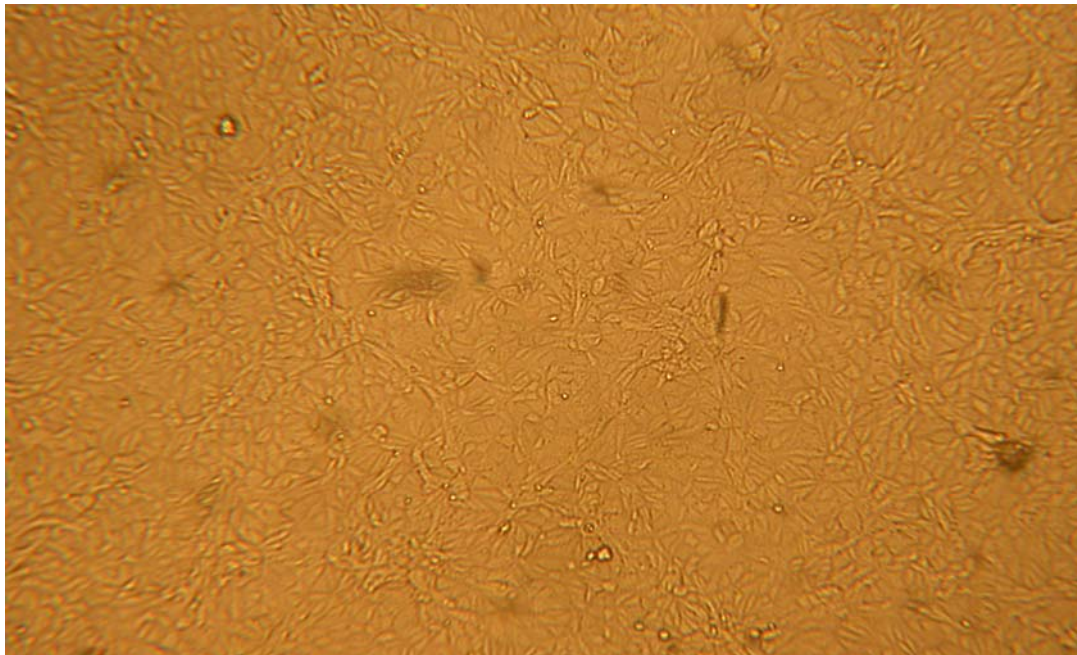
**Tabelle 21: Auflistung der im Verozelltest atypische Veränderungen auslösenden *E.coli*-Isolate nach Virulenzgenmuster, MRHA-Vermögen und Pathovarzugehörigkeit**

Virulenzgenmuster <sup>1)</sup>	Pathovare	n	Zahl der MRHA-positiven Isolate
<i>eae</i>	EPEC	1	-
<i>afa8, iucD</i>	ExPEC	3	-
<i>afa8, papC, f17A, iucD</i>	ExPEC	2	2
<i>afa8, papC, iucD</i>	ExPEC	1	-
<i>cnf1/2, papC</i>	NTEC	1	1
<i>cnf2, cdtIII</i>	NTEC	1	-
<i>cnf2, cdtIII, papC, iucD</i>	NTEC	1	-
<i>afa8</i>	???	1	-
negativ	Ohne Virulenzfaktor	1	-
Gesamt		12	3

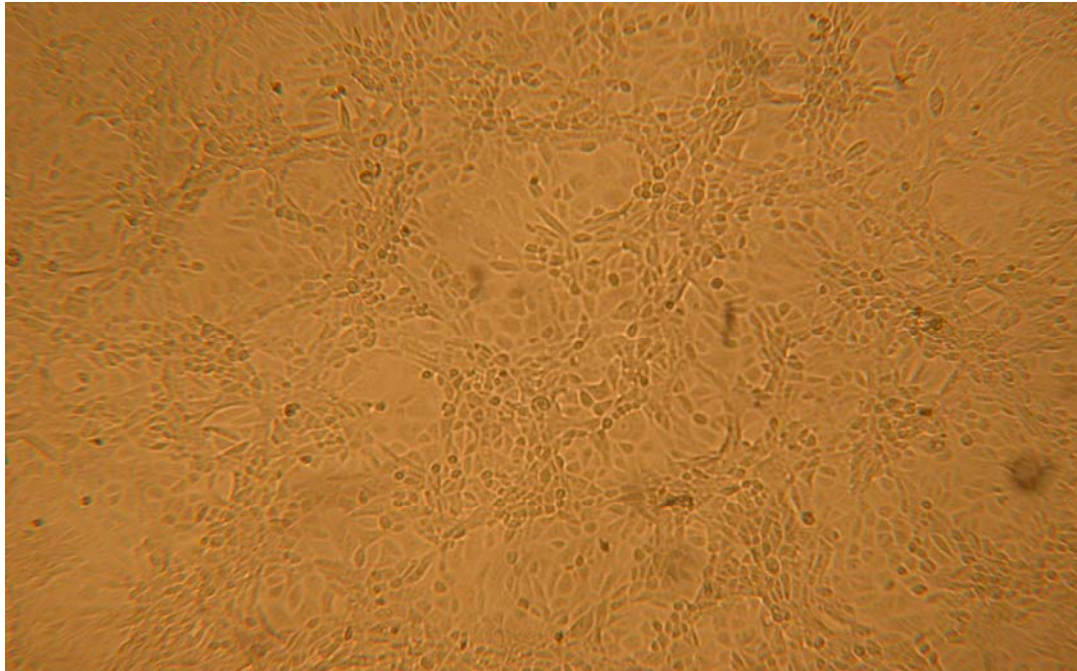
**Erläuterung:** MRHA = Mannose resistente Hämagglutination; - = negativ; n = Anzahl der Pathovare; ??? = Keine klare Pathovar-Zuordnung möglich; 1) = Erläuterung s. Tab. 11

**Abbildung 8: Darstellung der untypischen Wirkung der *E.coli*-Lysate auf Verozellen**

**A. Intakte Verozellen**



**B. Verozellen 48h nach Zugabe des *E.coli*-Lysates von P3626/03-1**



## 4 Diskussion

In der vorliegenden Studie an Kotproben von 95 bis zu 3 Wochen alten Kälbern mit Durchfallsymptomatik wurden insgesamt 100 *E.coli*-Isolate einer weitergehenden phäno- und genotypischen Charakterisierung unterzogen. Dabei war von besonderem Interesse, inwieweit die Isolate mit derzeit bekannten Virulenzfaktoren bzw. Genabschnitten ausgestattet waren und welchen *E.coli*-Pathovaren sie demzufolge zuzuordnen waren. Zudem wurden Informationen erwartet über ihre ursächliche Beteiligung an dem Durchfallgeschehen. Dies galt besonders in Bezug auf *E.coli*-Stämme, die der O-Gruppe O78:K80 zuzuordnen waren, diese *E.coli*-Sero-var wird besonders mit septikämischen Verlaufsformen von *E.coli*-Infektionen bei Kälbern (ohne Diarrhöerscheinungen) in Verbindung gebracht, doch gelang ihr Nachweis in der Routinediagnostik der letzten Jahre gehäuft auch aus Durchfallkot.

Eine parallel an 93 der 95 Kotproben durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchung erbrachte in 40 (43 %) den Nachweis von Viruspartikeln, bei denen es sich weitaus am häufigsten um Corona- (21) und Rotavirus (17) handelte. Prozentual gesehen liegen diese Anteile (22,6 % bzw. 18,3 %) im Bereich früherer Angaben aus Deutschland (BALJER et al., 1987; HERBST et al., 1987), während aus USA, England oder Kanada speziell für Rotaviren mit über 50 %, 42-50 % bzw. 27 % (MOON et al., 1976; REYNOLDS et al., 1984; ACRES et al., 1977) seinerzeit deutlich höhere Fallraten mitgeteilt worden waren.

Auf welchen Ursachen solche Unterschiede jeweils basierten und basieren, ob die Probenauswahl, geographische Schwankungen, unterschiedliche Haltungsbedingungen oder die inzwischen langjährige Praxis der Muttertierimpfung sich auswirkten, kann nur gemutmaßt werden. Da das hier verwendete Material als "zufällig ausgesucht" gelten kann, dürften die vorliegenden Prozentsätze für die Rota- und Coronaviruss-nachweise ein realistisches Bild über die derzeitige Prävalenz dieser Erreger beim Krankheitsbild "Kälberdiarrhö" im Einzugsbereich des hiesigen Fachbereiches bieten.

Ein besonderer Aspekt ergibt sich bei gleichzeitiger Berücksichtigung der Lebensalters der Kälber. Anhand der Verteilung der Virusnachweise auf die Kälber unter und über 10 Tagen Alter ist abzulesen, dass ähnlich wie in früheren und umfangreicheren Studien (HERBST et al., 1987) Rotavirus bevorzugt bei jüngeren Kälber nachzuweisen war (25 % gegenüber 6,25 %, Tab. 7).

Ein solches Verteilungsverhältnis von 4:1 zwischen den beiden Altersgruppen findet sich hingegen beim Coronavirus-Nachweis nicht, hier lag der Wert bei 1:1,2. Ein fast gleiches Verhältnis (1,04:1) hatten bereits BALJER et al. (1987) Mitte der 80er Jahre in Süddeutschland beobachtet, im Gegensatz zu HERBST et al. (1987), die über ein allmähliches Anwachsen der Coronavirusnachweise mit einem Maximum nach dem 10. Lebenstag (2.-4. Lebenswoche) berichtet hatten. Beim Vergleich solcher früher Daten mit Ergebnissen zwischen 1999 und 2002 hat sich gezeigt, dass Coronavirus inzwischen mit hohen Prävalenzraten um 20 % bei Kälbern mit Diarrhö bereits in den ersten 7 Lebenstagen vertreten ist (WEISS et al., 2003; HERBST persönliche Mitteilung). Dies korreliert im hohem Maße mit den vorliegenden Daten, ohne dass sich derzeit eine plausible Erklärung für diese mögliche Entwicklung vorlegen ließe.

Von den 100 im Rahmen der bakteriologischen Untersuchungen isolierten *E.coli*-Bakterien wiesen nur 7  $\alpha$ -Hämolysinbildung auf, ihre weitergehende Charakterisierung bezüglich O-Gruppen-Zugehörigkeit führte in 4 Fällen zur Reaktion mit dem Antiserum O78:K80, von denen sich indes 2 aufgrund der molekularbiologischen Ergebnisse der Pathovar NTEC und die beiden anderen keiner bestimmten Pathovar sicher zuordnen ließen. Zugleich waren aufgrund der bei allen 7 Isolaten wechselnden Ergebnisse in Bezug auf Serumresistenztest, MRHA und Zellkultur keine sicheren Hinweise auf eine Beteiligung dieser Stämme an dem vorliegenden Durchfallgeschehen zu erkennen. Dies unterstreicht die stete Erfahrung, dass bei der Kälberdiarrhö die Eigenschaft der Hämolysen sich im Gegensatz zum Schwein nicht als Merkmal zur Vorauswahl verdächtiger pathogener *E.coli*-Isolate im kulturellen bakteriologischen Kottausstrich verwenden lässt.

Die im Agardiffusionstest ermittelte Antibiotikaempfindlichkeit der *E.coli*-Stämme gibt einen Einblick in das Resistenzspektrum der hiesigen bovinen *E.coli*-Population. Ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren ist nur von sehr begrenzter Aussagekraft, da die Resistenzlage gerade bei *Enterobacteriaceae* oftmals großen regionalen Schwankungen unterworfen ist, je nach dem, welche Wirkstoffe in einem Bezirk vermehrt eingesetzt werden, sowie in welchem Maße überhaupt in der lokalen Tierpopulation Antibiotika eingesetzt werden. Demgemäß sind die vorliegenden Resultate als regionale "Übersicht" anzusehen, auf die im Fall einer Antibiotikagabe an Kälber mit Durchfallerkrankungen, soweit erforderlich, zurückgegriffen werden kann. Demzufolge würden im vorliegenden Fall die Wirkstoffe Amoxycillin/Clavulansäure, Colistin und Ceftiofur mit einer Resistenzrate zwischen 3 und 10 % die größte Aussicht auf Wirksamkeit gegenüber enteralen *E.coli*-Stämmen bieten, gefolgt von Gentamycin, Enrofloxacin und Florfenicol. Gegenüber letzteren drei erwiesen sich allerdings bereits ca. 1/5 alle *E.coli*-Kälber-Stämme als resistent.

## Serotypisierung

Die Bestimmung der O-Gruppen von *E.coli*-Isolaten aus dem Darm durchfallkranker Kälber und Ferkel wird als ein Verfahren zur orientierenden Vorauswahl potential pathogener *E.coli*-Stämme eingesetzt. Im Zusammenhang mit der Kälberdiarrhö stehen dabei vor allem *E.coli* der Gruppen O8, O9, O101 sowie O20 im Fokus, da bei solchen häufig gleichzeitig mit dem Vorhandensein enterotoxischer Virulenzfaktoren zu rechnen ist (ACRES et al, 1977; BRAATEN und MYERS, 1977; BUTLER und CLARKE, 1994).

Zusätzlich wird auf die Erfassung von *E.coli* der Gruppe O78(:K80) Wert gelegt, die bei verschiedenen *E.coli*-Pathovaren im Zusammenhang mit einer Reihe von extra- und intrainestinalen Krankheiten in Tieren und dem Menschen beschrieben sind und denen eine besondere Bedeutung für septikämische Erkrankungen, außer bei Vögeln, besonders bei neugeborenen Kälbern im europäischen Raum zugemessen wird (ØRSKOV und ØRSKOV, 1979; CONTREPOIS et al., 1986; DASSOULI-MRANI-BELBEKIR et al., 1988; GAY und BESSER, 1994; EWERS et al, 2003).

Mit Ausnahme von O20 standen Antiseren gegen diese O-Gruppen für die vorliegende Untersuchung zur Verfügung. Von den 66 insgesamt damit reagierenden *E.coli*-Isolaten verteilten sich 37 auf O78:K80, 19 auf die Gruppen 101 und 8 bzw. 2 auf die Gruppen O8 und O9 (**Abb. 3**). Demgegenüber hatten AL-DABBAS und WILLINGER (1986) vor ca. 25 Jahren unter 274 *E.coli*-Stämmen von diarrhöischen Saugkälbern in Österreich O78:K80 nur einmal nachweisen können, während die Prävalenz der anderen O-Gruppen um das Dreifache höher gelegen hatte (O101: 59,1 %, O9: 25,9 %, O8: 6,6 %). Dabei ist die relative Häufigkeitsverteilung dieser 3 O-Gruppen durchaus mit den eigenen Ergebnissen vergleichbar. Mit 34 % gegenüber 12,4 % überwiegt dagegen die Zahl der hier nicht serotypisierbaren Isolate deutlich. LEMA (1990) hatte in seinen Untersuchungen an Tansanischen Kälbern mit Diarrhö unter 497 MRHA-positiven *E.coli*-Stämmen nur 17 (3,4 %), die mit O101, O9, O8 oder O20-Antiseren reagierten. Solche Unterschiede in der O-Gruppenverteilung dürften bevorzugt auf regionale Varianten und/oder mögliche andere Auswahlkriterien der Probanden (z.T. höheres Alter, LEMA. 1990) zurückzuführen sein. Dessen ungeachtet bleibt die Ursache für den häufigen Nachweis von O78:K80-positiven Isolaten im hiesigen Material ungeklärt. Über eine Zunahme solcher Stämme in Kot von Kälbern mit Durchfall haben jüngst bereits EWERS et al. (2004) berichtet und ein mögliches Zoonosepotential von O78-positiven bovinen *E.coli* nicht ausgeschlossen.



### Hämagglutinationsstudien

Die Anheftung der *E.coli*-Bakterien an Epithelzellen, Erythrozyten oder andere Oberflächen erfolgt über Fimbrien und andere Adhäsine. Neben den von *E.coli* und vielen anderen Enterobakterien gebildeten F1-Fimbrien, die *in vitro* eine durch D-Mannose zu hemmende (Mannose-sensitive) Agglutination von Meerschweinchenerythrozyten vermitteln, sind zahlreiche weitere Anheftungsfaktoren bei *E.coli* beschrieben, deren adhätierenden und agglutinierenden Eigenschaften bei Erythrozyten durch Mannose nicht zu hemmen sind ("Mannose-resistente" Hämagglutination). Vorwiegend pathogene *E.coli* weisen Mannose-resistente, Fimbrien-vermittelte Adhärenz auf (LIOR, 1994), wobei die Verwendung von Erythrozyten verschiedener Spezies zur Beschreibung unterschiedlicher Hämagglutinationsmuster führte (EVANS et al., 1980; DUGUID et al., 1979; LEMA, 1990).

Von den hier untersuchten 100 *E.coli*-Isolaten lösten 42 eine MRHA aus, mit insgesamt 16 verschiedenen Mustern. Entgegen anderen Beobachtungen, dass am häufigsten eine MRHA mit arteigenen Erythrozyten vorkommt (HAGBERG et al, 1981; BROKHAGE, 1984; LEMA, 1990; SIMI et al, 2002), dominierten hier Reaktionen mit Schafererythrozyten (78,6 %) gefolgt von Rinder- (66,7 %) und Meerschweinchenerythrozyten (59,6 %). Auch dem von LEMA (1990) bei 41,5 % seiner 497 *E.coli*-Stämme von 202 Kälberkotproben festgestellten Muster 8, das ausschließlich mit Rindererythrozyten reagiert, standen in den eigenen Resultaten, soweit vergleichbar, nur 5 *E.coli*-Stämme (Muster 13 und 14, 11,9 %) gegenüber. Hier gab es hingegen eine leichte Häufung bei Muster 1 und 3 (16,7 % bzw. 14,3 %, Tab. 8). Die Gründe für diese Differenzen dürften auch hier vor allem in Unterschieden der Probandenauswahl zu suchen sein.

### Serumresistenz

Diese Eigenschaft wird wesentlich mit der Fähigkeit von *E.coli*-Bakterien, die natürlichen Abwehrsysteme im Blut von Wirtstieren, namentlich die Aktivierung des Komplementsystems zu unterlaufen, in Beziehung gebracht. Als ursächlich beteiligt werden dabei u.a. äußere Membranproteine, das Lipopolysaccharid glatt wachsender Bakterienstämme (sLPS), die Kapsel und das Colicin V angesehen (MOLL et al., 1980; WHITFIELD et al., 1994, GRENIER et al., 1991; NGELEKA et al., 1992; BURNS und HULL, 1998). Zugleich wird die Fähigkeit der meisten serumresistenten Stämme, Aerobaktin zu produzieren, als signifikanter Vorteil angesehen (MOHAMED OU SAID et al., 1988; DER VARTANIAN et al., 1992).

Die hier bei ca. der Hälfte (53) der 100 *E.coli*-Stämme nachgewiesene Serumresistenz verteilt sich gleichermaßen auf O78-positive und Non-O78-Stämme (51,3 % bzw. 55,6 %). Dies zeigt sich auch bei gesonderter Betrachtung der O101-positiven oder der anderen, nicht näher serotypisierten Isolate. Die 2 O9-positiven Isolate wiesen dagegen keine Serumresistenz auf. Umgekehrt waren die 8 Stämme der Gruppe O8 mit einer Ausnahme alle serumresistent. Ob diese Häufung zufällig ist oder nicht, lässt sich wegen der geringen Anzahl der O8-Stämme derzeit nicht sicher sagen. Allerdings werden *E.coli*-Stämme der Serogruppe O8 u.a. auch unter den septikämischen *E.coli* beim Kalb geführt (GAY und BESSER, 1994; ØRSKOV et al., 1977). Eine vermehrte Serumresistenz bei O78-positiven *E.coli* aus dem Darm diarrhöischer Kälber lässt sich hingegen im vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht feststellen.

### Genotypische Charakterisierung

Die an den *E.coli*-Stämmen mittels PCR durchgeführten Studien zur Feststellung ihrer Ausstattung mit 19 verschiedenen Virulenz-assoziierten Gensequenzen sollten einerseits dazu dienen, sie bestimmten *E.coli*-Pathovaren zuzuordnen, und andererseits Rückschlüsse bezüglich ihrer Beteiligung an dem klinischen Symptom "Diarrhö" ermöglichen. Summarisch betrachtet (**Abb. 4**) dominierten dabei *iucD*-positive Isolate (65 %), gefolgt von Stämmen mit genspezifischen Sequenzen für *afa8* (51 %), *papC* (34 %) und *f17A* (23 %), die sämtlich für Adhäsionsfaktoren stehen. Bei Aufteilung der *E.coli* in die Gruppen "O78-positiv" und "Non O78" blieb dieses Verteilungsmuster stets in der Reihenfolge und weitgehend auch in der Mengenverteilung erhalten (**Abb. 5 und 6**).

Die Gensequenzen verkörpern dabei zum einen die Basis für die Eisenakquisition der Bakterien mittels Aerobaktin (*iucD*). Diese ist essentiell für den Bakterienstoffwechsel und die Pathogenität von *E.coli*-Bakterien und ist bei extraintestinalen Infektionen offenbar von besonderer Bedeutung. So finden sich Aerobaktin-positive *E.coli*-Stämme in großem Maße bei Menschen mit Harnwegsinfektionen (JOHNSON, 1991). Zudem wird auf Zusammenhänge zwischen Aerobaktin-Produktion von *E.coli*-Stämmen und ihrer Fähigkeit, Septikämien bei Kälbern auszulösen, hingewiesen (GRIFFITHS, 1994). Allerdings ist auch über den gelegentlichen Nachweis des Aerobaktin-Systems bei enteropathogenen *E.coli* berichtet worden (ROBERTS et al., 1986). Schließlich hatten OSWALD et al. (1991) bei 70 % von 43 bovinen CNF2-positiven *E.coli*, die überwiegend der Gruppe O78 angehörten und von diarrhöischen Kälbern stammten, Aerobaktin-Produktion nachweisen können.

Zum anderen ist der vermehrte Nachweis der Adhäsionsfaktoren-kodierenden Gensequenzen *afa8*, *papC* und *f17A* ebenfalls nicht als überraschend anzusehen. *E.coli*-Stämme, positiv für *afa8*, wurden beim Rind aus Durchfallgeschehen und Septikämien isoliert (LE BOUGUENEC und BERTIN, 1999; LALIOUI et al., 1999; GERARDIN et al., 2000). *E.coli* mit Sequenzen des *pap*-Genclusters (P-Fimbrien) sind bevorzugt für extraintestinale Infektionen bekannt, namentlich im Urethraltrakt des Menschen und bei Hunden sowie im Zusammenhang mit Septikämien beim Schwein (BERTIN et al., 2000).

In Bezug auf das durchfallkranke Kalb wurden P-Fimbrien bei NTEC nachgewiesen (MAINIL et al., 1999), aber auch bei EAEC und ExPEC. F17-positive *E.coli* werden mit Durchfallgeschehen und Septikämien bei Rindern sowie Allgemeininfektionen bei Schafen in Verbindung gebracht (OSWALD et al., 1991; MAINIL et al., 2000), nicht selten lassen sich *f17*-Gensequenzen in NTEC zusammen mit den anderen genannten Adhäsion-vermittelnden Gensequenzen sowie mit *cnf1*- und *sfa*-Sequenzen nachweisen (MAINIL et al., 1999).

Der gleichermaßen hohe Anteil von *E.coli*-Stämmen, die in Bezug auf die 4 genannten Gensequenzen in der O78-Gruppe, wie in der Non-O78-Gruppe positiv reagierten, lässt dabei eine vermehrte Beteiligung der O78-positiven *E.coli* an Durchfallgeschehen des Kalbes eher als fraglich erscheinen. Dies wird zusätzlich dadurch unterstrichen, dass in der Gruppe der O78-positiven *E.coli* kaum Isolate mit Gensequenzen nachgewiesen wurden, die für Virulenzfaktoren mit klassischer diarrhöischer Wirkung kodieren. Lediglich 4 Isolate, die den NTEC zuzuordnen sind und von denen 2  $\alpha$ -Hämolysin-Bildner waren, könnten nach geltender Meinung außer als Ursache extraintestinaler Infektionen auch als potentielle Diarrhöerreger angesehen werden (BLANCO et al., 1994; 1996; POHL et al., 1997). Allerdings kommen sie vielfach auch bei gesunden Rindern (incl. Kälbern) vor und entsprechend ihrer begrenzten Virulenz werden sie als opportunistische Erreger eingestuft (VAN BOST et al., 2001b).

Im Gegensatz dazu finden sich in der Gruppe der Non-O78-Isolate in 7 Fällen Stämme mit der klassischen Virulenzgenausstattung von ETEC (*esta*, *fanA* und *fim41A*), SOBJINSKI (1998) hatte bei gesunden und durchfallkranken Kälbern in der 1. Lebenswoche eine Prävalenz von 6,4 % für *esta*-positive Isolate ermittelt und vereinzelt auch *e/t*-Nachweise in Kotproben gesunder Kälber geführt. Dies gelang in Übereinstimmung mit der Literatur (MOON et al., 1976; GUINEE et al., 1979; WRAY et al., 1993) im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht.

Desweiteren befanden sich in dieser Gruppe (Non-O78) 9 Isolate mit *eae*-Gensequenzen (4 davon zusätzlich *sxt1*-positiv). Von SOBJINSKI (1998) wurde bei durchfallkranken Kälbern ein signifikanter Zusammenhang zwischen Erkrankung und *eae*-Nachweis u.a. für die 1. Lebenswoche der von ihr untersuchten Kälber ermittelt und damit Daten früherer

experimenteller Untersuchungen an Kälbern bestätigt (FISCHER et al., 1994; DEAN-NYSTROM et al., 1997, 1998).

Auf der Basis der PCR-Ergebnisse konnte eine Einteilung der 100 *E.coli*-Isolate in die verschiedenen Pathovaren erfolgen (**Tab. 12**). Dabei überraschte der hohe Anteil an ExPEC (46 %), verglichen mit solchen Pathovaren, die als potentielle Diarrhöerreger beim Kalb angesehen werden (ETEC: 7 %; NTEC: 6 %; EPEC und EHEC: 5 % bzw. 4 %).

Bei Gegenüberstellung der Pathovaren mit dem Ergebnissen der Serotypisierung (**Tab. 13**) ergaben sich indes für die ExPEC-Isolate keine Schwerpunkte: Sie überwogen mit einer Ausnahme bei allen Serogruppen in ähnlicher Weise deutlich, so dass sich daraus keine Rückschlüsse in Bezug auf das Symptom "Diarrhö" ziehen lassen. Auch die vergleichende Berücksichtigung des Merkmals "Serumresistenz", das zwar schwer zu charakterisieren, aber deutlich mit der Fähigkeit von *E.coli*, extraintestinale Infektionen auszulösen, korreliert ist (GAY und BESSER, 1994), lässt kaum zielgerichtete Interpretationen zu (**Tab. 14**), dies steht z.T. mit der geringen Anzahl von Isolaten (z.B. EAEC, EHEC, O9:K35) in Verbindung, zum anderen erwies sich von den verschiedenen *E.coli*-Pathovaren immer wieder ca. die Hälfte der Stämme als serumresistent. Dies galt selbst für solche *E.coli*, die sich nicht sicher einer bestimmten Pathovar zuordnen ließen (8 von 17) bzw. keinen der hier untersuchten Virulenzfaktoren aufwiesen (8 von 13).

In Bezug auf die Serogruppenzugehörigkeit fand sich dagegen eine vergleichsweise hohe Rate serumresistenter Stämme bei den allerdings ebenfalls nur zahlenmäßig geringen Angehörigen der Gruppe O8 (7 von 8). *E.coli* dieser Serogruppe sind beim Kalb als Erreger intestinaler wie extraintestinaler Infektionen bekannt (GAY und BESSER, 1994; BUTLER und CLARKE, 1994). Von den 37 O78:K80-Isolaten erwies sich wiederum die Hälfte (19) als serumresistent. Somit fällt es auch in Bezug auf diese Parameter schwer, den Stellenwert des Merkmals "Serumresistenz" bei den *E.coli*-Isolaten von diarrhöischen Kälbern zu erfassen.

Die Anzahl der Rota- bzw. Coronavirusnachweise in den Kotproben sind nur bedingt mit Angaben anderer Autoren zu vergleichen, da die Auswahl der Proben in regionaler/überregionaler Hinsicht und in Bezug auf das Alter der Kälber von Bedeutung ist.

Die Auswirkung des Alters zeigt sich auch im eigenen Untersuchungsmaterial, da Rotavirus hier bevorzugt bei Kälbern unter 10 Tagen und Coronaviren auch in Proben älterer Tiere ähnlich häufig nachgewiesen wurde.

Vergleichsweise gering ist dabei die Zahl der Fälle (s. **Tab.15**), in denen gleichzeitig ETEC nachgewiesen wurde. Dies könnte allerdings mit der nur einmaligen und zeitlich nicht immer gleichen Kotprobenentnahme im Zusammenhang stehen, da bekanntlich die Aussicht, ETEC aus Kotproben an diesen Erregern erkrankter Kälber zu isolieren, sich im Laufe des

Infektionsgeschehens verschlechtert. Zudem ist natürlich eine Beteiligung von pathogenen *E.coli* an der viralen Darminfektion nicht immer gegeben. So erscheint es normal, außer den Viren die verschiedensten *E.coli*-Pathovaren und Stämme ohne bekannte Virulenzgensequenzen nachzuweisen, deren Bedeutung als Sekundärerreger im jeweiligen Geschehen selbst bei einem Nachweis von Virulenzfaktoren nicht sicher auszumachen ist.

Die Zahl der *E.coli*-Isolate mit Mannose-resistenter Hämagglutination lag bei 42 %, wobei Angehörige der Serogruppe O8 zu über 60 %, die der Gruppen O78, O101 und „Andere“ Serogruppen zu ca. 40 % positiv ausfielen (**Tab. 16**). Ihre Verteilung auf 16 verschiedene MRHA-Muster mit nur geringen Häufungen bei einzelnen Mustern (1, 3, 10, 11, 13) lassen Rückschlüsse auf die Bedeutung der jeweiligen Isolate nicht zu.

Bei Betrachtung der für diese Stämme nachgewiesenen, Adhäsionsfaktoren kodierenden Gensequenzen (**Tab. 18**) war indes zu erkennen, dass neben den Isolaten mit Sequenzen für F5 und F41 (7) hauptsächlich solche eine MRHA auslösten, die in Bezug auf *f17A*, allein oder in Kombination positiv ausgefallen waren (22). Von den übrigen waren nur 5 der insgesamt 14 *papC* + *afa8*-positiven *E.coli* auch MRHA-positiv. Dagegen lösten Stämme, die lediglich *papC*-, *afa8*- oder *eae*-positiv waren, höchstens ausnahmsweise eine MRHA aus (2 von 6, 1 von 20 bzw. 1 von 9 Stämmen). Offenbar sind solche *E.coli* dazu mit den eingesetzten Erythrozytenspezies nicht oder nur vereinzelt in der Lage gewesen. So ist z. B. bekannt, dass *pap*-Genprodukte (P-Fimbrien) zwar Mannose-resistent hämagglutinieren, aber nur bei Erythrozyten von Menschen mit einem Antigen-P-Blutgruppensystem (HACKER et al., 1985; FAIRBROTHER et al., 1992).

Demgegenüber wird die Adhäsion von F17-Fimbrien über die Bindung an N-Acetylglucosamin vermittelt, deren entsprechende Rezeptoren u.a. auf Erythrozyten von Kälbern vorhanden sind (EWERS et al., 2003). Entsprechend dazu erscheint es nicht überraschend, dass *f17A*-positive *E.coli*-Stämme bevorzugt mit Erythrozyten von Rind und Schaf Mannose-resistent reagierten (**Tab. 19**).

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsprüfung der *E.coli*-Isolate auf Verozellen waren in Bezug auf die 4 Stx-Bildner zu erwarten gewesen. Welche Faktoren bei den anderen 5 Isolaten unterschiedlicher Pathovar-Zugehörigkeit für die Zytotoxizität verantwortlich zu machen sind, muss zunächst ebenso offen bleiben, wie die Interpretation der von den 12 weiteren *E.coli*-Stämmen ausgelösten untypischen morphologischen Zellveränderungen.

## Schlussbetrachtung

Die in der vorliegenden Untersuchung an 95 Kotproben von durchfallkranken, bis zu 3 Wochen alten Kälbern erhobenen virologischen Befunde entsprechen in quantitativer Hinsicht den Ergebnissen früherer Erhebungen in Hessen und anderen deutschen Regionen (HERBST et al., 1987; BALJER et al., 1987). Dies zeigt zugleich, dass die seit Jahrzehnten gegebene Möglichkeit der Muttertiervakzinierung gegen bovine enterale Rota- und Coronaviren offenbar eine Abschwächung der Infektionsgefährdung bei neugeborenen Kälbern nicht bewirkt hat. Ob die auch hier beobachteten erhöhten Prävalenzraten an Coronaviren bei Kälbern unter 10 Lebenstagen eine nachhaltige Entwicklung widerspiegeln und worin die Gründe dafür bestehen könnten, ist in diesem Rahmen nicht zu beantworten.

Die unter 100 nachgewiesenen *E.coli*-Isolaten nur 7 mal zu registrierende  $\alpha$ -Hämolysinbildung konnte überhaupt nicht oder nur vage mit einer ursächlichen Beteiligung solcher Stämme an der Diarrhoe in Verbindung gebracht werden. Diese Eigenschaft ist somit beim Kalb auch unter Berücksichtigung von Serumresistenz, MRHA und Virulenzgenausstattung weiterhin nicht als orientierender Marker für darmpathogene *E.coli*, wie es beim Ferkel der Fall ist, zu verwenden. Die ebenfalls als ein Verfahren zur orientierenden Vorauswahl potentiell pathogener *E.coli*-Stämme eingesetzte Serotypisierung führte in 29 Fällen zum Nachweis von O-Gruppen, die bevorzugt mit enterotoxischen *E.coli* beim Kalb in Verbindung gebracht werden. Allerdings konnte nur bei 6 der 29 Isolate eine für ETEC klassische Ausstattung mit Virulenzgensequenzen bezüglich F5/F41 und hitzestabilem Enterotoxin nachgewiesen werden. Folglich kann die Einteilung der *E.coli*-Stämme von diarrhöischen Kälbern auf Basis der Zugehörigkeit zu bestimmten Serogruppen nur eingeschränkt zur Orientierung in der Routinediagnostik verwendet werden.

Zugleich lag der Gesamtanteil an ETEC mit 7 % zwar vergleichsweise durchaus in der Norm, und auch die Anzahl von EPEC und EHEC (n = 9) entsprachen früheren Angaben (SOBJINSKI, 1998). Dennoch muss die Nachweisrate von ETEC insgesamt als sehr niedrig angesehen werden. Entweder sind demzufolge ETEC aktuell tatsächlich nur an relativ wenigen Durchfallgeschehen beim Kalb beteiligt oder andere *E.coli*-Pathovaren (z. B. EHEC, EPEC) sind gleichermaßen als Auslöser von Kälberdiarrhöen zu berücksichtigen. Schließlich müssen auch die hier nicht erfassten Kryptosporidien als Sekundärerreger in Betracht gezogen werden. Grundsätzlich ist in jedem Fall zu bedenken, dass alle hier erhobenen Ergebnisse nur auf einer einmaligen Probenentnahme pro Kalb basierten, die zudem vermutlich nicht immer zum optimalen Zeitpunkt kurz nach Beginn der klinischen Erscheinungen erfolgt war, daher muss die Möglichkeit einer Dunkelziffer z. B. an ETEC in dem Probenmaterial in Betracht gezogen werden.

Als beträchtlich erwies sich hingegen der Anteil an *E.coli* die mit Antiserum gegen O78:K80 positiv (n = 37) reagierten. Allerdings ergab ihre Prüfung auf Serumresistenz, kombiniert mit der Ausstattung mit *iucD*-Gensequenzen (Aerobaktin) keine signifikanten Häufungen bei O78-positiven Isolaten. Folglich muss angenommen werden, dass ein Großteil dieser Isolate nicht mit dem typischen Muster für Stämme, die beim Kalb eine Septikämie auszulösen vermögen, ausgestattet waren. Da sie zugleich auch nur selten Gensequenzen mit Diarrhö-Potential aufwiesen, kommen diese Stämme als mögliche Durchfallerreger auf der Basis dieser Ergebnisse höchstens ausnahmsweise in Betracht, und ein Signalcharakter ist mit dem Nachweis von O78-positiven *E.coli*-Stämmen im Darm durchfallkranker Kälber nicht verbunden.

Die häufige Serumresistenz, wie auch die im Vergleich zu den anderen O-Gruppen vermehrt registrierte MRHA, die bei der (allerdings kleinen) Gruppe O8-positiver *E.coli*-Isolate beobachtet wurde verdient Beachtung. An einer größeren Zahl von Stämmen sollte verfolgt werden, ob diese Eigenschaften auf einer Beteiligung dieser *E.coli* an Durchfällen oder eventuell auch an septikämischen Infektionsverläufen beim Kalb hinweisen und u.U. mit einer bestimmten *E.coli*-Pathovar in Verbindung zu bringen sind.

Ebenso sollte den hier beobachteten Zusammenhängen zwischen dem Vorhandensein von *f17A*-Gensequenzen, allein oder in Kombination mit anderen Adhäsion vermittelnden molekularen Abschnitten bzw. Genprodukten, und der MRHA mit Rinder- und Schaferythrozyten in weiteren Studien nachgegangen werden. Insbesondere wäre hier von Interesse, ob diese Eigenschaften typisch für bovine *E.coli* aus Kälberdurchfällen sind, ob sie nur für *f17A* oder auch andere Gensequenzen der F17-Fimbrien-Familie gelten und mit welchen pathogenen Eigenschaften derartige *E.coli* in Verbindung zu bringen sind.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 100 *E.coli*-Isolate von 95 klinisch an Durchfall erkrankten Kälbern bis zu einem Alter von 3 Wochen auf ihre Virulenzeigenschaften untersucht. Ihre Charakterisierung erfolgte auf phäno- und genotypischer Basis. Zur Phänotypisierung dienten die Serotypisierung, das Hämolyse- und Hämagglutinationsverhalten sowie Serumresistenz und Zytotoxizität. Auf genotypischer Ebene konzentrierten sich die Studien auf den Nachweis von insgesamt 19 Virulenzgenen mittels verschiedener Multiplex-Polymerase-Kettenreaktionen.

Unter den 100 *E.coli*-Isolaten bildeten 7 Stämme  $\alpha$ -Hämolysin. Die Hämolysinbildung korrelierte nicht mit weiteren phäno- und genotypischen Merkmalen, die spezifisch für Durchfallerreger sind. Die mit Antiseren gegen 4 verschiedene O-Gruppen erfolgte Serotypisierung, führte in 29 Fällen zum Nachweis von Serogruppen, die bevorzugt bei enterotoxischen *E.coli* des Kalbes zu finden sind. Auf der Basis ihrer weiteren Virulenzgenausstattung ließen sich allerdings nur 6 Stämme den klassischen bovinen ETEC zuordnen. Somit besitzt die Serotypisierung zum orientierenden Auffinden boviner enterotoxischer *E.coli* nur begrenzt Aussagekraft.

Die Serogruppe O78 waren insgesamt bei 37 *E.coli*-Stämmen nachzuweisen. Der Rest von 34 Isolaten gehörte anderen O-Gruppen an. Die Genotypisierung anhand des Nachweises von Virulenzgensequenzen führte bei 46 der 100 Isolate zur Klassifizierung als ExPEC, bei 7 und 6 Stämmen als ETEC bzw. NTEC sowie bei 5, 4 bzw. 2 Stämmen als EPEC, EHEC bzw. als EAEC. In 17 Fällen war eine eindeutige Pathovar-Bestimmung nicht sicher möglich und die 13 restlichen Isolate waren in der Genotypisierung gänzlich negativ.

Vergleiche von Sero- und Genotypisierung zeigten, dass 17 der 37 O78-positiven Isolate den ExPEC (13) und NTEC (4) zuzuordnen waren, Beziehungen zu anderen *E.coli*-Pathovaren bestanden nicht. Bei zusätzlicher Berücksichtigung der Ergebnisse des Serumresistenztestes und der Mannose-resistenten Hämagglutination, wiesen Isolate der O78-Gruppe zu 51,3 % Serumresistenz bzw. zu 40,5 % mannose-resistente hämagglutinierende Eigenschaften auf. Die Prozentsätze der Non-O78-*E.coli* lagen mit Ausnahme der 8 O8:K87-positiven Isolate im gleichen Bereich. Letztere waren dagegen zu 87,5 % im Serumresistenztest und zu 62,5 % in der MRHA positiv.

In Bezug auf den hohen Anteil O78-positiver *E.coli* in Kotproben durchfallkranker Kälber ergaben sich auf der Basis vorliegender Ergebnisse keine Hinweise auf eine Beteiligung solcher Stämme an vorliegenden Durchfallgeschehen. Ebenso deuteten ihre Virulenzgenausstattung, z. B. hinsichtlich Eisenakquirierung (*iucD*), sowie ihr Verhalten im



Serumresistenztest nicht auf eine bevorzugte Fähigkeit zu septikämischen Infektionsverläufen dieser Isolate beim Kalb hin.

Beim Vergleich von Virulenzgenausstattung und MRHA wurden Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein von *f17A*-Gensequenzen und MRHA insofern auffällig, als 22 von 23 *E.coli*-Isolaten mit *f17A*-Gensequenzen, allein oder in Kombination mit anderen Adhäsion-vermittelnden Sequenzen, sich gleichzeitig auch als mannoseresistent hämagglutinierend erwiesen.

Eine Korrelation zwischen *E.coli*-Pathovar einer Kotprobe und dem Nachweis enteraler Viren ergab sich nicht. Insgesamt wiesen 40 von 93 Proben (43 %) Viren auf, es dominierten Corona- und Rotaviren (21 mal bzw. 17 mal) neben in Einzelfällen nachgewiesenen Picornavirus-ähnlichen-Partikeln, sowie Parvovirus.

## 6 Summary

In the present study, a total of 100 *E.coli* isolates of 95 calves up to 3 weeks old and suffering from diarrhea were tested for their virulence attributes. For characterization phenotypic determinants, such as serotype, hemolysis, hemagglutination, serum resistance and cytotoxicity, as well as genotyping methods were used. On genotyping level, investigation focused on the detection of 19 different virulence genes by use of several multiplex polymerase chain reactions.

Among the isolates 7 were  $\alpha$ -hemolytic. Hemolysin production of the strains did not correlate with other attributes characteristic for diarrheagenic *E.coli* from bovines. Serotyping performed with antisera against 4 different O-groups resulted in the detection of 29 strains belonging to serogroups preferentially being connected with enterotoxigenic *E.coli* (O8, O9 and O101). But as for their virulence gene out-fit, only 6 of them matched with classical bovine ETEC. Thus, serotyping of bovine *E.coli* did not prove to be a method sufficient for ETEC screening.

Serotyping of the other field isolates yielded 37 strains agglutinating with an O78 antiserum and the remainder obviously belonged to serogroups other than the 4 tested here. According to genotyping results the *E.coli* strains could be classified to different pathovars: 46 were identified as ExPEC, 7 and 6 as ETEC and NTEC. Furthermore, 5, 4 and 2 isolates corresponded to EPEC, EHEC and EAEC, respectively. Of the 30 strains remaining, 17 could not be classified clearly and 13 did not have any of the gene sequences, tested for in this study.

Comparing serotyping and genotyping results of the 37 O78 positive isolates showed 17 belonging to ExPEC (13) and NTEC (4), respectively. Relationship to the other *E.coli* pathovars did not exist. As for serum resistance and the mannose resistant hemagglutination, strains of the O78 group were positive in 51.3 % or 40.5 %. Percentage rates of non-O78 strains did not differ from this range, except 8 isolates of serogroup O8, of which 87.5 % showed serum resistance and 62.5 % mannose resistant hemagglutination.

With respect to the high level of O78 positive *E.coli* in fecal samples from calves with diarrhea, any evidence of those strains being involvement in the disease could not be detected, according to the results of the present study. Furthermore, an accumulation of strains within the O78 cluster with gene sequences like *iucD* for iron acquisition and serum resistance, indicative für *E.coli* isolates as potentially septicemic, could not be detected.

A correlation between the presence of *f17A* gene sequences, alone or together with other adhesion mediating sequences, with mannose resistant hemagglutination as seen in 22 of 23 isolates, should become subject of further studies.

Classification of the *E.coli* isolates to specific pathovars did not cohere to the electron optical findings. In total, 40 (43 %) of 93 fecal samples were virus positive with coronavirus and rotavirus dominating (21 and 17, respectively), followed by sporadic yields of picornavirus-like particles or parvovirus.

## 7 Literaturverzeichnis

AL-DABBAS; A. H. M. und WILLINGER; H. (1986)

Eigenschaften von aus diarrhöischen Saugkälbern isolierten *E.coli*-Stämmen

Wein. Tierärztl. Mschr. **73**, 217-222

ADAMS, T. M., WENTZEL, A., and KOLMAR, H. (2005)

Intimin-Mediated Export of Passenger Proteins Requires Maintenance of a Translocation-Competent Conformation

J. Bacteriol. **187**, 522-533

ACRES; S. D., SAUNDERS, J. R., and RADOSTITS, O. M. (1977)

Acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves: The prevalence of enterotoxigenic *E.coli*, reo-like (rota) virus and other enteropathogens in cow-calf herds.

Can. Vet. J. **18**, 113-121

ACOSTA-MARTINEZ, F., GYLES, CL., and BUTLER, DG. (1980)

*Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in feces and intestines of calves with diarrhea.

Am. J. Vet. Res. **41**, 1143-1149

AIDAR, L., PENTEADO, A. S., TRABULSI, L. R., BLANCO, J. E., BLANCO, M., BLANCO, J., and PESTANA DE CASTRO (2000)

Subtypes of intimin among non-toxigenic *Escherichia coli* from diarrheic calves in Brazil.

Can. J. Vet. Res. **64**, 15-20

AL-MAJALI, A. M., ASEM, E. K., LAMAR, C. H., ROBINSON, J. P., FREEMAN, M. J., and SAEED, A. M. (2000)

Characterization of the interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) with its putative receptor on the intestinal tract of newborn calves

FEMS Immunol. Med. Microbiol. **28**, 97-104

ARANDA, K. R. S., FAGUNDES-NETO, U., and SCALETISKY, I. C. A. (2004)

Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp

J. Clin. Microbiol. **42**, 5849-5853

BABAI, R., STERN, B., HACKER, J., and RON, E. (2000)  
New Fimbrial Gene Cluster of S-Fimbrial Adhesin Family  
Infect. Immun. **68**, 5901-5907

BALDWIN, T. J., KNUTTON, S., SELLERS, L., HERNANDEZ, H. A., AITKEN, A. and WILLIAMS, P. H. (1992)  
Enteroaggregative *Escherichia coli* strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to *E.coli* hemolysin  
Infect. Immun. **60**, 2092-2095

BALJER, G., EICHHORN, W., GÖBEL, E., WOLF, M., und BACHMANN, P. A. (1987)  
Vorkommen und Verbreitung wichtiger Durchfallerreger bei neugeborenen Kälbern in Süddeutschland im Zeitraum 1984 bis 1986  
Tierarztl. Umsch. **1**; 56-65

BERNIER, C., GOUNON, P., and LE BOUGUENEC, C. (2002)  
Identification of an Aggregative Adhesion Fimbria (AAF) Type III-Encoding Operon in Enteroaggregative *Escherichia coli* as a Sensitive Probe for Detecting the AAF-Encoding Operon Family  
Infect. Immun. **70**, 4302-4311

BERTHIAUME, F., CROST, C., LABRIE, V., MARTIN, C., NEWMAN, E. B., HAREL, J. (2004)  
Influence of L-Leucine and L-Alanine on Lrp Regulation of *foo*, Coding for F165<sub>1</sub>, a Pap Homologue  
J. Bacteriol. **186**, 8537-8541

BERTIN, Y., GIRARDEAU, J., DARFEUILLE-MICHAUD, A., and MARTIN, C. (2000)  
Epidemiological Study of *pap* Genes among Diarrheagenic or Septicemic *Escherichia coli* Strains Producing CS31A and F17 Adhesins and Characterization of Pap<sub>31A</sub> Fimbriae.  
J. Clin. Microbiol. **38**, 1502-1509

BERTIN, Y., MARTIN, C., OSWALD, E., and GIRARDEAU, J. (1996)  
Rapid and Specific Detection of F17-Related Pilin and Adhesin Genes in Diarrheic and Septicemic *Escherichia coli* Strains by Multiplex PCR  
Infect. Immun. **34**, 2921-2928

BERTIN, Y., MARTIN, C., GIRARDEAU, J., POHL, P., and CONTREPOIS, M. (1998)  
Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among  
CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea  
FEMS Microbiol. Lett. **162**, 235-239

BEUTIN, L. (1999)  
*Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats  
Vet. Res. **30**, 285-298

BHASKARAN, S., JAY, C. M., BERGHMAN, L. R., WAGNER, G. G., and WAGHELA, S.  
D. (2005)  
A Single-chain Fragment Variable Recombinant Antibody against F5 Fimbria of  
Enterotoxigenic *Escherichia coli* Inhibits Agglutination of Horse Red Blood Cells Induced  
by F5 Protein  
Vet. Res. Commun. **29**, 463-476

BINDEREIF, A., and NEILANDS, J. B. (1983)  
Cloning of the Aerobactin-Mediated Iron Assimilation System of Plasmid ColV  
J. Bacteriol. **153**, 1111-1113

BISCHOFF, C., LÜTHY, J., ALTWEGG, M., and BAGGI, F. (2005)  
Rapid detection of diarrheagenic *E.coli* by Real-time PCR  
J. Microbiol. Methods. **61**, 335-341

BLANCO, M., BLANCO, J. E., BLANCO, J., VERBRUGGEN, A., and JANSEN, W. H.  
(1994)  
Serotypes of bovine *Escherichia coli* producing cytotoxic necrotizing factor type 2 (CNF2)  
Vet. Microbiol. **39**, 83-88

BLANCO, M., BLANCO, J. E., MORA, A. and BLANCO, J. (1998a)  
Prevalence and characteristics of necrotoxigenic *Escherichia coli* CNF1<sup>+</sup> and CNF2<sup>+</sup> in  
healthy cattle  
Res. Microbiol. **149**, 47-53

- BLANCO, M., BLANCO, J. E., MORA, J. F., and BLANCO, J. (1998b)  
Distribution and characterization of faecal necrotoxicogenic *Escherichia coli* CNF1<sup>+</sup> and CNF2<sup>+</sup> isolated from healthy cows and calves  
Vet. Microbiol. **59**, 183-192
- BLANCO, M., PADOLA, N. L., KRÜGER, A., SANZ, M. E., BLANCO, J. E., GONZALEZ, E. A., DAHBI, G., MORA, A., and et al. (2004b)  
Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina  
Int. Microbiol. **7**, 269-276
- BLANCO, J. E., BLANCO, M., ALONSO, M. P., MORA, A., DAHBI, G., COIRA, M. A., and BLANCO, J. (2004a)  
Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Human Patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999  
J. Clin. Microbiol. **42**, 311-319
- BLANCO, J., CID, D., BLANCO, J. E., BLANCO, M., RUIZ SANTA QUITEIRA, J. A., and DE LA FUENTE, R. (1996)  
Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs in Spain  
Vet. Microbiol. **49**, 209-217
- BLANCO, J., GONZALEZ, E. A., GARCIA, S., BLANCO, M., REGUEIRO, B., and BERNARDEZ, I. (1988a)  
Production of Toxins by *Escherichia coli* Strains Isolated from Calves with Diarrhoea in Galicia (North-western-Spain)  
Vet. Microbiol. **18**, 297-311
- BLANCO, J., GONZALEZ, E. A., BLANCO, M., ALONSO, M. P., and BARBADILLO, M. J. (1988b)  
Toxins and Serotypes of Faecal Non-Enterotoxigenic and Non-Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Causing Mannose-Resistant Haemagglutination: Relation with haemagglutination Patterns  
Zbl. Bakt. Hyg. A. **269**, 43-55

BLANC-POTARD, A., TINSLEY, C., SCALETSKY, I., LE BOUGUENEC, C., GUIGNOT, J., SERVIN, A. L., NASSIF, X., and BERNET-CAMARD, M. (2002)

Representational Difference Analysis between Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli* and Nonpathogenic *E.coli* K-12

Infect. Immun. **70**, 5503-5511

BLANK, T. E., ZHONG, H., BELL, A. L., WHITTAM, T. S., and DONNENBERG, M. S. (2000)

Molecular Variation among Type IV Pilin (*bfpA*) Genes from Diverse Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains

Infect. Immun. **68**, 7028-7038

BOCZEK, L. A., JOHNSON, C. H., RICE, E. W., and KINKLE, B. K. (2006)

The widespread occurrence of the enterohemolysin gene *ehlyA* among environmental strains of *Escherichia coli*

FEMS Microbiol. Lett. **254**, 281-284

BOUZAIR, S., OLOOMI, M., and OSWALD, E. (2005)

Detection of the cytolethal distending toxin locus *cdtB* among diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from humans in Iran

Res. Microbiol. **156**, 137-144

BRAATEN, B. A., and MYERS, L. L. (1977)

Biochemical characteristics of enterotoxigenic and nonenterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea

Am. J. Vet. Res. **38**, 1989-1991

BROKHAGE, J. (1984)

Hämagglutination, Kolonisationsfaktoren und Enterotoxinbildung bei *Escherichia coli*-Stämmen von Enteritispatienten in Peru

Hum. Med. Diss., Hamburg

BRUNDER, W., SCHMIDT, H., and KARCH, H. (1997)

EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factorV

Mol. Microbiol. **24**, 767-778



- BURNS, A. L., BALL, H. J., and FINLAY, D. A. (1996)  
CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland  
Vet. Microbiol. **49**, 235-241
- BURNS, S. M., and HULL, S. (1998)  
Comparison of Loss of Serum Resistance by Defined Lipopolysaccharide Mutants and an Acapsular Mutant of Uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5  
Infect. Immun. **66**, 4244-4253
- BUTLER, D. G., and CLARKE, R. C. (1994)  
Diarrhoea and Dysentery in Calves  
In Gyles, C. L. (ed.) *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, pp, 91-116
- BUSATO, A., LENTZE, T., HOFER, D., BURNENS, A., HENTRICH, B., and GAILLARD, C. (1998)  
A case control study of potential enteric pathogens for calves raised in cow-calf herds  
Zentralbl. Veterinarmed. B. **45**, 519-528
- BÜRK, C., DIETRICH, R., ACAR, G., MORAVEK, M., BÜLTE, M., and MÄRTLBAUER, E. (2003)  
Identification and Characterization of a New Variant of Shiga Toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of Bovine Origin  
J. Clin. Microbiol. **41**, 2106-2112
- CANTEY, J. R., and BLAKE, R. K. (1977)  
Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism  
J. Infect. Dis. **135**, 454-462
- CARBONETTI, N., and WILLIAMS, P. (1984)  
A Cluster of Five Genes Specifying the Aerobactin Iron Uptake System of Plasmid ColV-K30  
Infect. Immun. **46**, 7-12

CARBONETTI, N. H., BOONCHAI, S., PARRY, S. H., VÄISÄNEN-RHEN, V., KORHONEN, T. K., and WILLIAMS, P. H. (1986)

Aerobactin-Mediated Iron Uptake by *Escherichia coli* Isolates from Human Extraintestinal Infections

Infect. Immun. **51**, 966-968

CID, D., SANZ, R., MARIN, I., DE GREVE, H., RUIZ-SANTA-QUITEIRA, J. A., AMILS, R., and DE LA FUENTE, R. (1999)

Characterization of Nonenterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Producing F17 Fimbriae Isolated from Diarrheic Lambs and Goat Kids

J. Clin. Microbiol. **37**, 1370-1375

CID, D., RUIZ-SANTA-QUITEIRA, J. A., MARIN, I., SANZ, R., ORDEN, J. A., AMILS, R., and DE LA FUENTE, R. (2001)

Association between intimin (*eae*) and EspB gene subtypes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs and goat kids

Microbiology. **147**, 2341-2353

CHIPPERFIELD, J. R., and RATLEDGE, C. (2000)

Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study

BioMetals. **13**, 165-168

CLEARY, J., LAI, L. C., SHAW, R. K., STRAATMAN-IWANOWSKA, A., DONNENBERG, M. S., FRANKEL, G., and KNUTTON, S. (2004)

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin

Microbiology. **150**, 527-538

COIMBRA, R. S., GRIMONT, F. LENORMAND, P., BURGUIERE, P., BEUTIN, L., and GRIMONT, P. A. D. (2000)

Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (*rfb*-RFLP)

Res. Microbiol. **151**, 639-654

CONTREPOIS, M., DUBOURGUIER, H. C., PARODI, A. L. GIRARDEAU, J. P., and OLLIER, J. L. (1986)

Septicaemic *Escherichia coli* and Experimental Infection of calves

Vet. Microbiol: **12**, 109-118

CROSA, J. H. (1984)

The Relationship of Plasmid-Mediated Iron Transport and Bacterial Virulence

Ann. Rev. Microbiol. **38**, 69-89

CZECZULIN, J. R., BALEPUR, S., HICKS, S., PHILLIPS, A., HALL, R., KOTHARY, M. H., NAVARRO-GARCIA, F., and NATARO, J. P. (1997)

Aggregative Adherence Fimbria II, a Second Fimbrial Antigen Mediating Aggregative Adherence in Enteropathogenic *Escherichia coli*

Infect. Immun. **65**, 4135-4145

CZECZULIN, J. R., WHITTAM, T., HENDERSON, I. R., NAVARRO-GARCIA, F., and NATARO, J. P. (1999)

Phylogenetic Analysis of Enteropathogenic and Diffusely Adherent *Escherichia coli*

Infect. Immun. **67**, 2692-2699

DASSOULI-MRANI-BELKEBIR, A. CONTREPOIS, M., GIRARDEAU, JP., and DER VARTANIAN, M. (1988)

Characters of *Escherichia coli* O78 isolated from septicaemic animals

Vet. Microbiol: **17**; 345-356

DEAN-NYSTROM, E. A., BOSWORTH, B. T., CRAY, W. C., and MOON, H. W. (1997)

Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the Intestines of Neonatal Calves

Infect. Immun. **65**, 1842-1848

DEAN-NYSTROM, E. A., BOSWORTH, B. T., MOON, H. W., and O'BRIEN, A. D. (1998)

*Escherichia coli* O157:H7 Requires Intimin for Enteropathogenicity in Calves

Infect. Immun. **66**, 4560-4563

DE GRANDIS, S., GINSBERG, J., TOONE, M., CLIMIE, S., FRIESEN, J., and BRUNTON, J. (1987)

Nucleotide Sequence and Promoter Mapping of *Escherichia coli* Shiga-Like Toxin Operon of Bacteriophage H-19B

J. Bacteriol. **169**, 4313-4319

DER VARTANIAN, M. (1988)

Differences in Excretion and Efficiency of the Aerobactin and Enterochelin Siderophores in a Bovine Pathogenic Strain of *Escherichia coli*

Infect. Immun. **56**, 413-418

DER VARTANIAN, M., JAFFEUX, B., CONTREPOIS, M., CHAVAROT, M., GIRARDEAU, J. P., BERTIN, Y., and MARTIN, C. (1992)

Role of Aerobactin in Systemic Spread of an Opportunistic Strain of *Escherichia coli* from the Intestinal Tract of Gnotobiotic Lambs

Infect. Immun. **60**, 2800-2807

DE RYCKE, J., and OSWALD, E. (2001)

Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation?

FEMS Microbiol. Lett. **203**, 141-148

DE RYCKE, J., GONZALEZ, E. A., BLANCO, J., OSWALD, E., BLANCO, M., and BOIVIN, R. (1990)

Evidence for two Types of Cytotoxic Necrotizing Factor in Human and Animal Clinical Isolates of *Escherichia coli*

J. Clin. Microbiol. **28**, 694-699

DE RYCKE, J., MILON, A., and OSWALD, E. (1999)

Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens

Vet. Res. **30**, 221-233

DEZFULIAN, H., BATISSON, I., FAIRBROTHER, M. J., LAU, P. C. K., NASSAR, A., SZATMAIR, G., and HAREL, J. (2003)

Presence and Characterization of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Virulence Genes in F165-Positive *E.coli* Strains Isolated from Diseased Calves and Pigs

J. Clin. Microbiol. **41**, 1375-1385

DIAS DA SILVEIRA, W., FERREIRA, A., BROCCHI, M., DE HOLLANDA, L. M., DE CASTRO, A., YAMADA, A., and LANCELLOTTI, M. (2002)

Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains

Vet. Microbiol. **85**, 47-53

DOLL, K., WEIRATHER, P., KÜCHLE, H. M. (1995)

Kälberdurchfall als Bestandsproblem: Betriebsinterne Faktoren und häufige Behandlungsfehler.

Prakt. Tierarzt **11**, 995-1004

DONNENBERG, M. S., and KAPER, J. B. (1991)

Construction of an *eae* Deletion Mutant of Enteropathogenic *Escherichia coli* by Using a Positive-Selection Suicide Vector

Infect. Immun. **59**, 4310-4317

DONNENBERG, M. S., and KAPER, J. B. (1992)

Enteropathogenic *Escherichia coli*

Infect. Immun. **60**, 3953-3961

DONNENBERG, M. S., KAPER, J. B., and FINLAY, B. B. (1997)

Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells

Trends. Microbiol. **5**, 109-114

DONNENBERG, M. S., and WHITTAM, T. S. (2001)

Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*

J. Clin. Invest. **107**, 539-548

- DOZOIS, C. M., FAIRBROTHER, J. M., HAREL, J., and BOSSE, M. (1992)  
*pap-* and *pil*-Related DNA Sequences and Other Virulence Determinants Associated with *Escherichia coli* Isolated from Septicemic Chickens and Turkeys  
Infect. Immun. **60**, 2648-2656
- DUGUID, J. P., CLEGG, S., and WILSON, M. I. (1979)  
The fimbrial and non-fimbrial heamagglutinins of *Escherichia coli*  
J. Med. Microbiol. **12**, 213-227
- ELIAS, W. P. JR., CZECZULIN, J. R., HENDERSON, I. R., TRABULSI, L. R., and NATARO, J. P. (1999)  
Organization of Biogenesis Genes for Aggregative Adherence Fimbria II Defines a Virulence Gene Cluster in Enteroaggregative *Escherichia coli*  
J. Bacteriol. **181**, 1779-1785
- EL MAZOUARI, K., OSWALD, E., HERNALSTEENS, J. P., LINTERMANS, P., and DE GREVE, H. (1994)  
F17-Like Fimbriae from an Invasive *Escherichia coli* Strain Producing Cytotoxic Necrotizing Factor Type 2 Toxin  
Infect. Immun. **62**, 2633-2638
- EVANS, D. G., EVANS, D. J., and TJOA, W. (1977)  
Hemagglutination of Human Group A Erythrocytes by Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Adults with Diarrhea: Correlation with Colonization Factor  
Infect. Immun. **18**, 330-337
- EVANS, D. J., EVANS, D. G., YOUNG, L. S., and PITT, J. (1980)  
Hemagglutination typing of *Escherichia coli*: definition of seven hemagglutination types  
J. Clin. Microbiol. **12**, 235-242
- EVANS, D. G., SILVER, R. P., EVANS, D. J., CHASE, D. G., and GORBACH, S. L. (1975)  
Plasmid- controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans  
Infect. Immun. **12**, 656-667

EWERS, C., JANßEN, T., and WIELER, L. H. (2003)

Aväre pathogene *Escherichia coli* (APEC)

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **116**, 381-395

EWERS, C., SCHÜFFNER, C., WEISS, R., BALJER, G., and WIELER, L. H. (2004)

Molecular characteristics of *Escherichia coli* Serogroup O78 strains isolated from diarrheal cases in bovines urge further investigations on their zoonotic potential

Mol. Nutr. Food. Res. **48**, 504-514

FAIRBROTHER, J. M., BROSS, A., JACQUES, M., and LARIVIERE, S. (1989)

Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K“ V165” strains isolated from pigs with diarrhea.

Am. J. Vet. Res. **50**, 1029-1036

FAIRBROTHER, J., HAREL, J., FORGET, C., DESAUTELS, C., and MOORE, J. (1992)

Receptor Binding Specificity and Pathogenicity of *Escherichia coli* F165-positive Strains Isolated from Piglets and Calves and Possessing *pap* Related Sequences

Can. J. Vet. Res. **57**, 53-55

FECTION, G., FAIRBROTHER, J. M., HIGGINS, R., VAN METRE, D. C., PARE, J., SMITH, B. P., HOLMBERG, C. A. and JANG, S. (2001)

Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from the blood of bacteremic neonatal calves

Vet. Microbiol. **78**, 241-249

FENG, L., WANG, W., TAO, J., GUO, H., KRAUSE, G., BEUTIN, L., and WANG, L. (2004)

Identification of *Escherichia coli* O114 O-Antigen Gene Cluster and Development of an O114 Serogroup-Specific PCR Assay

J. Clin. Microbiol. **42**, 3799-3804

FENG, L., SENCHENKOV, S. N., TAO, J., SHASHOKV, A., LIU, B., SHEVELEV, S. D., REEVES, P. R., XU, J., KNIREL, Y. A., and WANG, L. (2005)

Structural and Genetic Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 O Antigen and Development of an O145 Serogroup-Specific PCR Assay

J. Bacteriol. **187**, 758-764

- FERNANDEZ-BEROS, M. E., KISSEL, V., LIOR, H., and CABELLO, F. (1990)  
Virulence-Related Genes in ColV Plasmids of *Escherichia coli* Isolated from Human Blood and Intestines  
J. Clin. Microbiol. **28**, 742-746
- FISCHER, J., MADDOX, C., MOXLEY, R., KINDEN, D., and MILLER, M. (1994)  
Pathogenicity of a bovine attaching effacing *Escherichia coli* isolate lacking Shiga toxins  
Am. J. Vet. Res. **55**, 991-999
- FRANCK, S. M., BOSWORTH, B. T., and MOON, H. W. (1998)  
Multiplex PCR for Enterotoxigenic, Attaching and Effacing, and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains from Calves  
J. Clin. Microbiol. **36**, 1795-1797
- FUJII, Y., HAYASHI, M., HITOTSUBASHI, S., FUKE, Y., YAMANAKA, H., and OKAMOTO, K. (1991)  
Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II  
J. Bacteriol. **173**, 5516-5522
- GANABA, R., BIGRAS-POULIN, M., FAIRBROTHER, J. M., and BELANGER, D. (1995)  
Importance of *Escherichia coli* in Young Beef Calves from Northwestern Quebec  
Can. J. Vet. Res. **59**, 20-25
- GANNON, V. P. J., RASHED, M., KIHG, R. K., and THOMAS, E. J. G. (1993)  
Detection and Characterization of the *eae* Gene of Shiga-Like-Toxin-Producing *Escherichia coli* Using Polymerase Chain Reaction  
J. Clin. Microbiol. **31**, 1268-1274
- GAY, C. C., and BESSER, T. E. (1994)  
*Escherichia coli* Septicaemia in Calves  
In Gyles, C. L. (ed.) *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, pp, 75-90



GERARDIN, J., LALIOUI, L., JACQUEMIN, E., LE BOUGUENEC, C., and MAINIL, J. G. (2000)

The *afa*-related gene cluster in necrotoxicogenic and other *Escherichia coli* from animals belongs to the *afa*-8 variant

Vet. Microbiol. **76**, 175-184

GIAMPAPA, C. S., ABRAHAM, S. N., CHIANG, T. M., and BEACHEY, E. H. (1988)

Isolation and Characterization of a Receptor for Type 1 Fimbriae of *Escherichia coli* from Guinea Pig Erythrocytes

J. Bacteriol. Chem. **263**, 5362-5367

GIAMMANCO, G. M., PIGNATO, S., GRIMONT, F., GRIMONT, P. A. D., CAPRIOLI, A., MORABITO, S., and GIAMMANCO, G. (2002)

Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Isolated in Italy and in France

J. Clin. Microbiol. **40**, 4619-4624

GIRARDEAU, J. P., LALIOUI, L., SAID, A. M., DE CHAMPS, C., and LE BOUGUENEC, C. (2003)

Extended Virulence Genotype of Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Carrying the *afa*-8 Operon: Evidence of Similarities between Isolates from Humans and Animals with Extraintestinal Infections

J. Clin. Microbiol. **41**, 218-226

GIRON, J. A., JONES, T., MILLAN-VELASCO, F., CASTRO-MUNOZ, E., ZARATE, L., FRY, J., FRANKEL, G., MOSELEY, S. L., BAUDRY, B., KAPER, J. B. and et. al. (1991)

Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico

J. Infect. Dis. **163**, 507-513

GOLDMAN, R. C., WHITE, D., ØRSKOV, F., ØRSKOV, I., RICK, P. D., LEWIS, M. S., BHATTACHARJEE, A. K., and LEIVE, L. (1982)

A Surface Polysaccharide of *Escherichia coli* O111 Contains O-Antigen and Inhibits Agglutination of Cells by O-Antiserum

J. Bacteriol. **151**, 1210-1221

- GOMES, T. A., ABE, C. M., and MARQUES, L. R. (1995)  
Detection of HeLa cell-detaching activity and alpha-hemolysin production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of Brazilian children  
J. Clin. Microbiol. **33**, 3364
- GOPHNA, U., PARKET, A., HACKER, J., and RON, E. Z. (2003)  
A novel ColV plasmid encoding type IV pili  
Microbiology. **149**, 177-184
- GRENIER, D., and BELANGER, M. (1991)  
Protective Effect of *Prophyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles against Bactericidal Activity of Human Serum  
Infect. Immun. **59**, 3004-3008
- GRIFFITHS, E. (1994)  
Iron Acquisition Systems in *Escherichia coli*  
In Gyles, C. L. (ed.) *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, pp. 533-566
- GUINEE, P. A. M., and JANSEN, W. H. (1979)  
Detection of Enterotoxigenity and Attachement factors in *Escherichia coli* strains of Human, Procine and Bovine Origin; a Comparative Study  
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. **A243**, 245-257
- GYLES, C. L. (1994)  
*Escherichia coli* Verotoxins and Other Cytotoxins  
In Gyles, C. L. (ed.) *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, pp. 365-398
- HACKER, J., SCHMIDT, G., HUGHES, C., KNAPP, S., MARGET, M., and GOEBEL, W. (1985)  
Cloning and Characterization of Genes Involved in Production of Mannose-Resistant, Neuraminidase-Susceptible (X) Fimbriae from a Uropathogenic O6:K15:H31 *Escherichia coli* Strain  
Infect. Immun. **47**, 434-440

HADDAD, J. E., and JACKSON, M. (1993)

Identification of the Shiga Toxin A-Subunit Residues Required for Holotoxin Assembly  
J. Bacteriol. **175**, 7652-7657

HAGBERG, L., JODAL, U., KORHONEN, T. K., LIDIN-JANSON, G., LINDBERG, U., and EDEN, C. S. (1981)

Adhesion, Hemagglutination, and Virulence of *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections

Infect. Immun. **31**, 564-570

HAREL, J., FAIRBROTHER, J., FORGET, C., DESAUTELS, C., and MOORE, J. (1993)

Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves

Vet. Microbiol. **38**, 139-155

HARRINGTON, S. M., DUDLEY, E. G., and NATARO, J. P. (2006)

Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection

FEMS Microbiol. Lett. **254**, 12-18

HENKEL, W. (1971)

Serumresistenz und „Nephropathogenität“ antigenetisch definierter Stämme von *E.coli*

Z. Med. Mikrobiol. U. Immunol. **156**, 284-296

HERBST, W., LANGE, H., und KRAUSS, H. (1987)

Die Rota- und Coronavirusinfektionen des Kalbes aus diagenostischer Sicht

Tierarztl. Umsch. **4**, 296-300

HERRERO, M., DE LORENZO, V., and NEILANDS, J. B. (1988)

Nucleotide Sequence of the *iucD* Gene of the pColV-K30 Aerobactin Operon and Topology of Its Product Studied with *phoA* and *LacZ* Gene Fusions

J. Bacteriol. **170**, 56-64

HOLLAND, R. E., WILSON, R. A., HOLLAND, M. S., YUZBASIYAN-GURKAN, V., MULLANEY, T. P., and WHITE, D. G. (1999)

Characterization of *eae*<sup>+</sup> *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves

Vet. Microbiol. **66**, 251-263

HORNITZKY, M. A., MERDIECA, K., BETTELHEIM, K. A., and DJORDJEVIC, S. P. (2005)

Bovine Feces from Animals with Gastrointestinal Infections Are a Source of Serologically Diverse Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga Toxin-Producing *E.coli* Strains That Commonly Possess Intimin

Appl. Environ. Microbiol. **71**, 3405-3412

HOSCHÜTZKY, H., LOTTSPEICH, F., and JANN, K. (1989)

Isolation and Characterization of the  $\alpha$ -Galactosyl-1,4- $\beta$ -Galactosyl-Specific Adhesin (P Adhesin) from Fimbriated *Escherichia coli*

Infect. Immun. **57**, 76-81

HWANG, J., BIEBER, D., RAMER, S. W., WU, C. Y., and SCHOOLNIK, G. K. (2003)

Structural and Topographical Studies of the Type IV Bundle-Forming Pilus Assembly Complex of Enteropathogenic *Escherichia coli*

J. Bacteriol. **185**, 6695-6701

HULL, R. A., DONOVAN, W. H., TERZO, M. D., STEWART, C., ROGERS, M., and DAROUICHE, R. O. (2002)

Role of Type 1 Fimbria- and P Fimbria-Specific Adherence in Colonization of the Neurogenic Human Bladder by *Escherichia coli*

Infect. Immun. **70**, 6481-6484

JALLAT, C., LIVRELLI, V., DARFEUILLE-MICHAUD, A., RICH, C., and JOLY, B. (1993)

*Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains

J. Clin. Microbiol. **31**, 2031-2037

JANKA, A., BIELASZEWSKA, M., DOHRINDT, U., GREUNE, L., SCHMIDT, M. A., and KARCH, H. (2003)

Cytolethal Distending Toxin Gene Cluster in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> and O157:H7: Characterization and Evolutionary Considerations

Infect. Immun. **71**, 3634-3638

JANKE, B. H., FRANCIS, D. H., COLLINS, J. E., LIBAL, M. C., ZEMAN, D. H., and JOHNSON, D. D. (1989)

Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs, and dogs

J. Vet. Diagn. Invest. **1**, 6-11

JANßEN, T., SCHWARZ, C., PREIKSCHAT, P., VOSS, M., PHILIPP, H. C., and WIELER, L. H. (2001)

Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis

Int. J. Med. Microbiol. **291**, 371-378

JERSE, A. N., and KAPER, J. B. (1991)

The *eae* Gene of Enteropathogenic *Escherichia coli* Encodes a 49-Kilodalton Membrane Protein, the Expression of Which Is Influenced by the EAF Plasmid

Infect. Immun. **59**, 4302-4309

JOHNSON, W. M., and LIOR, H. (1987)

Response of Chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin

FEMS Microbiol. Lett. **43**, 19-23

JOHNSON, J. R. (1991)

Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection

Clin. Microbiol. Rev. **4**, 80-128

JOHNSON, J. R., STELL, A. L., SCHEUTZ, F., O'BRYAN, T. T., RUSSO, T. A., CARLINO, U. B., FASCHING, C., KAVLE, J., DIJK, L. V., and GAASTRA, W. (2000)

Analysis of the F Antigen-Specific *papA* Alleles of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Using a Novel Multiplex PCR-Based Assay

Infect. Immun. **68**, 1587-1599.

KAIPAINEN, T., POHJANVIRTA, T., SHPIGEL, N. Y., SCHWIMMER, A., PYÖRÄLÄ, S., and PELKONEN, S. (2002)

Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis

Vet. Microbiol. **85**, 37-46

KAPER, J. B. (1998)

EPEC delivers the goods

Trends. Microbiol. **6**, 169-173

KAPER, J. B., NATARO, J. P., and MOBLEY, H. L. T. (2004)

Pathogenic *Escherichia coli*

Microbiology. **2**, 123-140

KHALIL, S. B., CASSELS, F. J., SHAHEEN, H. I., PANNELL, L. K., EL-GHORAB, N., KAMAL, K., MANSOUR, M., SAVARINO, S. J., and PERUSKI, L. F. JR. (1999)

Characterization of an Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strain from Africa Expressing a Putative Colonization Factor

Infect. Immun. **67**, 4019-4026

KIMATA, K., SHIMA, T., SHIMIZU, M., TANAKA, D., ISOBE, J., GYOBU, Y., WATAHIKI, M., and NAGAI, Y. (2005)

Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR

Microbiol. Immunol. **49**, 485-492

KOBAYASHI, H., SHIMADA, J., NAKAZAWA, M., MOROZUMI, T., POHJANVIRTA, T., PELKONEN, S., and YAMAMOTO, K. (2001)

Prevalence and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Healthy Cattle in Japan

Appl. Environ. Microbiol. **67**, 484-489

KOBAYASHI, H., MIURA, A., HAYASHI, H., OGAWA, T., ENDO, T., HATA, F., EGUCHI, M., and YAMAMOTO, K. (2003)

Prevalence and Characteristics of *eae*-Positive *Escherichia coli* from Healthy Cattle in Japan

Appl. Environ. Microbiol. **69**, 5690-5692

KREFT, B., CARSTENSEN, O., STRAUBE, E., BOHNET, S., HACKER, J., and MARRE, R. (1992)

Adherence to and Cytotoxicity of *Escherichia coli* for Eucaryotic Cell Lines Quantified by MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromide)

Zbl. Bakt. **276**, 231-242

KROGH, H. V., and HENRIKSEN, S. A. (1985)

Bovine cryptosporidiosis in Denmark. 2. Cryptosporidia associated with neonatal calf diarrhea

Nord. Vet. Med. **37**, 42-47

LAFONT, J. P., DHO, M., D'HAUTEVILLE, H. M., BREE, A., and SANSONETTI, P. J. (1987)

Presence and Expression of Aerobactin Genes in Virulent Avian Strains of *Escherichia coli*

Infect. Immun. **55**, 193-197

LALIOUI, L., JOUVE, M., GOUNON, P., and LE BOUGUENEC, C. (1999)

Molecular Cloning and Characterization of the *afa-7* and *afa-8* Gene Clusters Encoding Afimbrial Adhesins in *Escherichia coli* Strains Associated with Diarrhea or Septicemia in Calves

Infect. Immun. **67**, 5048-5059

LEMA, B. E. (1990)

Untersuchungen zur Ätiologie infektiöser Diarrhoen bei Kälbern in Tansania

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere. Vet. Diss. Justus-Liebig-Universität. Giessen

LAN, R., ALLES, M. C., DONOHOE, K., MARTINEZ, M. B., and REEVES, P. R. (2004)

Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp

Infect. Immun. **72**, 5080-5088

LAW, D. (2000)

Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E.coli*

J. Appl. Microbiol. **88**, 729-745

LE BOUGUENEC, C., ARCHAMBAUD, M., and LABIGNE, A. (1992)

Rapid and Specific Detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* Adhesin-Encoding Operons in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains by Polymerase Chain Reaction

J. Clin. Microbiol. **30**, 1189-1193

- LE BOUGUENEC, C., and BERTIN, Y. (1999)  
AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals  
Vet. Res. **30**, 317-342
- LE BOUGUENCE, C., LALIOUI, L., DU MERLE, L., JOUVE, M., COURCOUX, P., BOUZARI, S., SELVARANGAN, R., NOWICKI, B. J., GERMANI, Y., ANDREMONT, A., GOUNON, P., and GARCIA, M. I. (2001)  
Characterization of AfaE Adhesins Produced by Extraintestinal and Intestinal Human *Escherichia coli* Isolates: PCR Assays for Detection of Afa Adhesins That Do or Do Not Recognize Dr Blood Group Antigens  
J. Clin. Microbiol. **39**, 1738-1745
- LEVERTON, L. Q., and KAPER, J. B. (2005)  
Temporal Expression of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence Genes in an In Vitro Model of Infection  
Infect. Immun. **73**, 1034-1043
- LEVINE, M. M. (1987)  
*Escherichia coli* that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent  
J. Infect. Dis. **155**, 377-389
- LEYING, H., SUERBAUM, S., KROLL, H. P., STAHL, D., and OPFERKUCH, W. (1990)  
The Capsular Polysaccharide Is a Major Determinant of Serum Resistance in K-1-Positive Blood Culture Isolates of *Escherichia coli*  
Infect. Immun. **58**, 222-227
- LINGGOOD, M. A., ROBERTS, M., FORD, S., PARRY, S. H., and WILLIAMS, P. (1987)  
Incidence of the Aerobactin Iron Uptake System Among *Escherichia coli* Isolates From Infections of Farm Animals  
J. Gen. Microbiol. **133**, 835-842



LIOR, H. (1994)

Classification of *Escherichia coli*

In Gyles, C. L. (ed.) *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, pp, 31-72

LOPES, L. M., FABBRICOTTI, S. H., FERREIRA, A. J. P., KATO, M. A. F., MICHALSKI, J., and SCALETISKY, I. C. A. (2005)

Heterogeneity among Strains of Diffusely Adherent *Escherichia coli* Isolated in Brazil

J. Clin. Microbiol. **43**, 1968-1972

MAINIL, J., BEX, F., COUTURIER, M., and KAECKENBEECK, A. (1985)

Hybridization on bovine enterotoxigenic *Escherichia coli* with heat-stable enterotoxin gene probes

Am. J. Vet. Res. **12**, 2582-2584

MAINIL, J. G., DAUBE, G., JACQUEMIN, E., POHL, P., and KAECKENBEECK, A. (1998)

Virulence plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from piglets

Vet. Microbiol. **62**, 291-301

MAINIL, J. G., DUCHESNES, C. J., WHIPP, S. C., MARQUES, L. R. M., O'BRIEN, A. D., CASEY, T. A., MOON, H. W. (1987)

Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea

Am. J. Vet. Res. **48**, 743-748

MAINIL, J. G., BOX, F., JACQUEMIN, E., and POHL, P. (1990)

Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle

Am. J. Vet. Res. **51**, 187-190

MAINIL, J. G., GERARDIN, J., and JACQUEMIN, E. (2000)

Identification of the F17 fimbrial subunit- and adhesin-encoding (*f17A* and *f17G*) gene variants in necrotoxicogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans

Vet. Microbiol. **73**, 327-335

- MAINIL, J. G., JACQUEMIN, E., HERAULT, F., and OSWALD, E. (1997)  
Presence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-Related Sequences in Necrotoxicogenic *Escherichia coli* Isolates from Cattle: Evidence for New Variants of the AFA Family  
Can. J. Vet. Res. **61**, 193-199
- MAINIL, J. G., JACQUEMIN, E. R., KAECKENBEECK, A. E., and POHL, P. H. (1993)  
Association between the effacing (*eae*) gene and the Shiga-like toxin-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle  
Am. J. Vet. Res. **54**, 1064-1068
- MAINIL, J. G., JACQUEMIN, E., POHL, P., FAIRBROTHER, J. M., ANSUINI, A., LE BOUGUENEC, Ch., BALL, H. J., DE RYCKE, J., and OSWALD, E. (1999)  
Comparison of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from farm animals and from humans  
Vet. Microbiol. **70**, 123-135
- MAINIL, J. G., JACQUEMIN, E., and OSWALD, E. (2003)  
Prevalence and identity of *cdt*-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli*  
Vet. Microbiol. **94**, 159-165
- MAINIL, J. G., MOSELEY, S. T., SCHNEIDER, R. A., SUTCH, K., CASEY, T. A., and MOON, H. W. (1986)  
Hybridization of bovine *Escherichia coli* isolates with gene probes for four enterotoxins (STaP, STaH, STb, LT) and one adhesion factor  
Am. J. Vet. Res. **5**, 1145-1148
- MALDONADO, Y., FISER, J. C., NAKATSU, C. H., and BHUNIA, A. K. (2005)  
Cytotoxicity Potential and Genotypic Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Environmental and Food Sources  
Appl. Environ. Microbiol. **71**, 1890-1898
- MARINI, R. P., TAYLOR, N. S., LIANG, A. Y., KNOX, K. A., PENA, J. A., SCHAUER, D. B., and FOX, J. G. (2004)  
Characterization of Hemolytic *Escherichia coli* Strains in Ferrets: Recognition of Candidate Virulence Factor CNF1  
J. Clin. Microbiol. **42**, 5904-5908

MARQUART, M. E., PICKING, W. L. and PICKING, W. D. (1996)

Soluble invasion plasmid antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri* elicits epithelial cell responses related to pathogen invasion

Infect. Immun. **64**, 4182-4187

MELO, A. R., LASUNSKAIA, E. B., DE ALMEIDA, C. M. C., SCHRIEFER, A., KIPNIS, T. L., and DIAS DE SILVA, W. (2005)

Expression of the Virulence Factor, BfpA, by Enteropathogenic *Escherichia coli* is Essential for Apoptosis Signalling but not for NF- $\kappa$  B Activation in Host cell

Scand. J. Immunol. **61**, 511-519

MERCADO, E. C., RODRIGUEZ, S. M., D'ANTUONO, A. L., CIPOLLA, A. L., ELIZONDO, A. M., ROSSETTI, C. A., MALENA, R., and MENDEZ, M. A. (2003)

Occurrence and Characteristics of CS31A Antigen-Producing *Escherichia coli* in Calves with Diarrhoea and Septicaemia in Argentina

J. Vet. Med. B. **50**, 8-13

MERCADO, E. C., GIOFFRE, A., RODRIGUEZ, S. M., CATALDI, A., IRINO, K., ELIZONDO, A. M., CIPOLLA, A. L., ROMANO, M. I., MALENA, R., and MENDEZ, M. A. (2004)

Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Isolated from Diarrhoeic Calves in Argentina

J. Vet. Med. B. **51**, 82-88

MOHAMED OU SAID, A., CONTREPOIS, G. M., DER VARTANIAN, M., and GIRARDEAU, P. (1988)

Virulence factors and markers in *Escherichia coli* from calves with bacteremia

Am. J. Vet. Res. **49**, 1657-1660

MOL, O., and OUDEGA, B. (1996)

Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*

FEMS. Microbiol. Rev. **19**, 25-52

- MOLL, A., MANNING, P. A., and TIMMIS, K. N. (1980)  
Plasmid-determined resistance to serum bactericidal activity: a major outer membrane protein, the *traT* gene product, is responsible for plasmid-specified serum resistance in *Escherichia coli*  
Infect. Immun. **28**, 359-367
- MOKADY, D., GOPHNA, U., and RON, E. Z. (2005)  
Extensive Gene Diversity in Septicemic *Escherichia coli* Strains  
J. Clin. Microbiol. **43**, 66-73
- MOON, H. W., WHIPP, S. C., and SKARTVEDT, S. M. (1976)  
Etiologic Diagnosis of Diarrheal Diseases of Calves: Frequency and Methods for Detecting Enterotoxin and K99 Antigen Production by *Escherichia coli*  
Am. J. Vet. Res. **37**, 1025-1029
- MOON, H. W., WHIPP, S. C., ARGENZIO, R. A., LEVINE, M. M., and GIANNELLA, R. A. (1983)  
Attaching and Effacing Activities of Rabbit and Human Enteropathogenic *Escherichia coli* in Pig and Rabbit Intestines  
Infect. Immun. **41**, 1340-1351
- MOON, Y. H., TANABE, T., FUNAHASHI, T., SHIUCHI, K. I., NAKAO, H., and YAMAMOTO, S. (2004)  
Identification and Characterization of Two Contiguous Operons Required for Aerobactin Transport and Biosynthesis in *Vibrio mimicus*  
Microbiol. Immunol. **48**, 389-398
- MULVEY, M. A. (2002)  
Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*  
Cell. Microbiol. **4**, 257-271
- NAGY, B., and FEKETE, P. (2005)  
Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine  
Int. J. Med. Microbiol. **295**, 443-454

NATARO, J., DENG, Y., MANEVAL, D. R., GERMAN, A. L., MARTIN, W. C., and LEVINE, M. M. (1992)

Aggregative Adherence Fimbriae I of Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediate Adherence to HEP-2 Cells and Hemagglutination of Human Erythrocytes

Infect. Immunol. **60**, 2297-2304

NATARO, J. P., and KAPER, J. B. (1998)

Diarrheagenic *Escherichia coli*

Infect. Immun. **11**, 142-201

NATARO, J. P., and LEVINE, M. M. (1994)

*Escherichia coli* Diseases in Humans

In Gyles, C.L. (ed.) *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, pp, 285-333

NAVARRO-GARCIA, F., ESLAVA, C., VILLASECA, J. M., LOPEZ-REVILLA, R., CZECHULIN, J. R., SRINIVAS, S., NATARO, J. P., and CRAVIOTO, A. (1998)

In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*

Infect. Immun. **66**, 3149-3154

NAVARRO-GARCIA, F., SEARS, C., ESLAVA, C., CRAVIOTO, A., and NATARO, J. P. (1999)

Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*

Infect. Immun. **67**, 2184-2192

NAYLOR, S. W., GALLY, D. L., and LOW, J. C. (2005)

Enterohaemorrhagic *E.coli* in veterinary medicine

Int. J. Med. Microbiol. **296**, 419-441

NEILANDS, J. B. (1991)

Mechanism and regulation of synthesis of aerobactin in *Escherichia coli* K12 (pColV-K30)

Can. J. Microbiol. **38**, 728-733

- NGELEKA, M., HAREL, J., JACQUES, M., and FAIRBROTHER, J. M. (1992)  
Characterization of a Polysaccharide Capsular Antigen of Septicemic *Escherichia coli* O115: K“V165”:F165 and Evaluation of Its Role in Pathogenicity  
Infect. Immun. **60**, 5048-5056
- NGUYEN, T. V., VAN, P. L., HUUY, C. L., GIA, K. N., and WEINTRAUB, A. (2005)  
Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi.Vietnam  
J. Clin. Microbiol. **43**, 755-760
- NIELSEN, E. M., and ANDERSEN, M. T. (2003)  
Detection and Characterization of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* by Automated 5' Nuclease PCR Assay  
J. Clin. Microbiol. **41**, 2884-2893
- NISHIKAWA, Y., ZHOU, Z., HASE, A., OGASAWARA, J., KITASE, T., ABE, N., NAKAMURA, H., WADA, T., ISHII, E., HARUKI, K., and TEAM, S. (2002)  
Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from Stools of Sporadic Cases of Diarrheal Illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: Prevalence of Enteroaggregative *E.coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 Gene-Possessing *E.coli*  
Jpn. J. Infect. Dis. **55**, 183-190
- O'BRIEN, A. O., LIVELY, T. A., CHEN, M. E., ROTHMAN, S. W., and FORMAL, S. B. (1983)  
*Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin  
Lancet. **1**, 702
- OKEKE, I. N., and NATARO, J. P. (2001)  
Enterotoxigenic *Escherichia coli*  
Lancet. Infect. Dis. **1**, 304-313
- ONO, E., ABE, K., NAKAZAWA, M., and NAIKI, M. (1989)  
Ganglioside Epitope Recognized by K99 Fimbriae from Enterotoxigenic *Escherichia coli*  
Infect. Immun. **57**, 907-911

OSEK, J. (2001)

Characterization of Necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) Strains Isolated from Healthy Calves in Poland

J. Vet. Med. B. **48**, 641-646

OSEK, J., GALLIEN, P., and PROTZ, D. (2000)

Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from calves in Poland

Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **23**, 267-276

OSWALD, E., SUGAI, M., LABIGNE, A., WU, H. C., FIORENTINI, C., BOQUET, P., and O'BRIEN, A. O. (1994)

Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers

Proc. Natl. Acad. Sci. **91**, 3814-3818

OSWALD, E., DE RYCKE, J., LINTERMANS, P., VAN MUYLEM, K., MAINIL, J., DAUBE, G., and POHL, P. (1991)

Virulence Factors Associated with Cytotoxic Necrotizing Factor Type Two in Bovine Diarrheic and Septicemic Strains of *Escherichia coli*

J. Clin. Microbiol. **29**, 2522-2527

ORDEN, J. A., CID, D., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A., GARCIA, S. MARTINEZ, S., and DE LA FUENTE, R. (2002)

Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E.coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E.coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain

J. Appl. Microbiol. **93**, 29-35

ØRSKOV, F., and ØRSKOV, I. (1992)

*Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals

Can. J. Microbiol. **38**, 699-704

ØRSKOV, F., and ØRSKOV, I. (1984)

Serotyping of *Escherichia coli*

Methods in Microbiology, **14**, 44-112

ØRSKOV, F., and ØRSKOV, I. (1977)

Special *Escherichia coli* Serotypes from Enteropathies in Domestic Animals and Man  
Zbl. Vet. Med. **29**, 7-14

ØRSKOV, I., ØRSKOV, F., JANN, B., and JANN, K. (1977)

Serology, Chemistry, and Genetics of O and K Antigens of *Escherichia coli*  
Bacteriol. Rev. **41**, 667-710

ØRSKOV, I., WACHSMUTH, I. K., TAYLOR, D. N. (1991)

Two new *Escherichia coli* O groups: O172 from "shigella-like" toxin II producing strains (EHEC) and O173 from enteroinvasive *E.coli* (EIEC)  
APMIS. **99**, 30-32

PANIAGUA, M., ESPINOZA, F., RINGMAN, M., REIZENSTEIN, E., SVENNERHOLM, A. M., and HALLANDER, H. (1997)

Analysis of Incidence of Infection with Enterotoxigenic *Escherichia coli* in a Prospective Cohort Study of Infant Diarrhea in Nicaragua  
J. Clin. Microbiol. **35**, 1404-1410

PATON, J. C., and PATON, A. W. (1998)

Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections  
Clin. Microbiol. Rev. **11**, 450-479

PAIVA DE SOUSA, C., and DANIEL DUBREUIL, J. (2001)

Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*  
Int. J. Med. Microbiol. **291**, 15-20

PEARCE, M. C., JENKINS, C., VALI, L., SMITH, A. W., KNIGHT, H. I., CHEASTY, T., SMITH, H. R., GUNN, G. J., WOOLHOUSE, M. E. J., AMYES, S. G. B., and FRANKEL, G. (2004)

Temporal Shedding Patterns and Virulence Factors of *Escherichia coli* Serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a Cohort of Beef Calves and Their Dams  
Appl. Environ. Microbiol. **70**, 1708-1716



PERUSKI, L. F. JR., BRANDFORD, A. K., EL-YAZEED, R. A., EL-ETR, S.H., CRAVIOTO, A., WIERZBA, T. F., RAO, M., EL-GHORAB, N., SHAHEEN, H., KHALLI, S. B., KAMAL, K., WASFY, M. O., SVENNERHOLM, A. M., CLEMENS, J. D., and SAVARINO, S. J. (1999)

Phenotypic Diversity of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains from a Community-Based Study of Pediatric Diarrhea in Periurban Egypt  
J. Clin. Microbiol. **37**, 2974-2978

PICKETT, C. L., and WHITEHOUSE, C. S. (1999)

The cytolethal distending toxin family  
Trends. Microbiol. **7**, 292-297

PICKETT, C. L., LEE, R. B., EYIGOR, A., ELITZUR, B., FOX, E. M., STROCKBINE, N. A. (2004)

Patterns of Variations in *Escherichia coli* Strains That Produce Cytolethal Distending Toxin  
Infect. Immun. **72**, 684-690

PIVA, I. C., PEREIRA, A. L., FERRAZ, L. R., SILVA, R. S. N., VIEIRA, A. C., BLANCO, J. E., BLANCO, M., BLANCO, J. and GIUGLIANO, L. G. (2003)

Virulence Markers of Enteraggregative *Escherichia coli* Isolated from Children and Adults with Diarrhea in Brasilia, Brazil  
J. Clin. Microbiol. **41**, 1827-1832

POHL, P., IMBRECHTS, H., MARIN, M., SCHLICKER, C., and STOCKMANS, F. (1997)

Prévalence des genes codant pour les cytotoxines necrosantes (CNF1 et CNF2) chez des *Escherichia coli* isoées de bovins malades ou asymptomatiques  
Ann. Med. Vet. **141**, 161-164

POSPISCHIL, A., MAINIL, J. G., BALJER, G., and MOON, H. W. (1987)

Attaching and effacing bacteria in the intestines of calves and cats with diarrhea  
Vet. Pathol. **24**, 330-334

PROULX, F., SEIDMAN, E. G., and KARPMAN, D. (2001)

Pathogenesis of Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome  
Pediatr. Res. **50**, 163-171

RAMACHANDRAN, V., BRETT, K., HORNITZKY, M. A., DOWTON, M., BETTELHEIM, K. A., WALKER, M. J., and DJORDJEVIC, S. P. (2003)

Distribution of Intimin Subtypes among *Escherichia coli* Isolates from Ruminant and Human Sources

J. Clin. Microbiol. **41**, 5022-5032

REYNOLDS, D.J., MORGAN, J. H., CHANTER, N., JONES, P. W., BRIDGER, J. C., DEBNEY, T.G., and BUNCH, K. J. (1986)

Microbiology of calf diarrhea in southern Britain

Vet. Res. **119**, 34-38

RIISING, H. J., MURMANS, M., and WITVLIET, M. (2005)

Protection Against Neonatal *Escherichia coli* Diarrhoea in Pigs by Vaccination Sows with a New Vaccine that Contains Purified Enterotoxigenic *E.coli* Virulence factors F4ac, F4ab, F5 and F6 Fimbrial Antigens and Heat-Labile *E.coli* Enterotoxin (LT) Toxoid

J. Vet. Med. B. **52**, 296-300

ROBERTS, M., LEAVITT, R. W., CARBONETTI, N. H., FORD, S., COOPER, R. A., and WILLIAMS, P. H. (1986)

RNA-DNA hybridization analysis of transcription of the plasmid ColV-K30 aerobactin gene cluster

J. Bacteriol. **167**, 467-472

ROBINSON, C. M., SINCLAIR, J. F., SMITH, M. J., and O'BRIEN, A. D. (2006)

Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization

PNAS. **103**, 9667-967

SANDHU, K. S., CLARKE, R. C., MCFADDEN, K., BROUWER, A., LOUIE, M., WILSON, J., LIOR, H., and GYLES, C. L. (1996)

Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario

Epidemiol. Infect. **166**, 1-7

SANDHU, K. S., and GYLES, C. L. (2002)

Pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the intestine of calves

Can. J. Vet. Res. **66**, 65-72

SCHEMBRI, M. A., SOKURENKO, E. V., and KLEMM, P. (2000)

Functional Flexibility of the FimH Adhesin: Insights from a Random Mutant Library

Infect. Immun. **68**, 2638-2646

SCHEUTZ, F., CHEASTY, T., WOODWARD, D., and SMITH, H. R. (2004)

Designation of O147 and O157 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E.coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E.coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179 and O181

APMIS. **112**, 569-584

SHAHEEN, H. I., KHALIL, S. B., RAO, M. R., ABU ELYAZEED, R., WIERZBA, T. F., PERUSKI, L. F., PUTNAM, S., NAVARRO, A., MORSY, B. Z., et al. (2004)

Phenotypic Profiles of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Associated with Early Childhood Diarrhea in Rural Egypt

J. Clin. Microbiol. **42**, 5588-5595

SHAW, D. J., JENKINS, C., PEARCE, M. C., CHEASTY, T., GUNN, G. J., DOUGAN, G., SMITH, H. R., WOOLHOUSE, M. E. J., and FRANKEL, G. (2004)

Shedding Patterns of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Strains in a Cohort of Calves and Their Dams on a Scottish Beef Farm

Appl. Environ. Microbiol. **70**, 7456-7465

SHENG, H., DAVIS, M. A., KNECHT, H. J., HANCOCK, D. D., VAN DONKERSGOED, J., and HOVDE, C. J. (2005)

Characterization of a Shiga Toxin-, Intimin-, and Enterotoxin

Hemolysin-Producing *Escherichia coli* ONT:H25 Strain Commonly Isolated from Healthy Cattle

J. Clin. Microbiol. **43**, 3213-3220

SHIN, S. J., CHANG, Y. F., TIMOUR, M., LAUDERDALE, T. L., and LEIN, D. H. (1994)  
Hybridization of clinical *Escherichia coli* isolates from calves and piglets in New York State with gene probes for enterotoxins (STaP, STb, LT), Shiga-like toxins (SLT-1, SLT-II) and adhesion factors (K88, K99, F41, 987P)

Vet. Microbiol. **38**, 217-225

SILVEIRA, W. D., BENETTI, F., LANCOLLOTTI, M., FERREIRA, A., SOLFERINI, V. N., BROCCHI, M. (2001)

Biological and Genetic Characteristics of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains

Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. **43**, 303-310

SIMI, S., PELOSI-TEIXEIRA, E., YAMADA, A. T., JOAZEIRO, P. P., CATANI, C. F., and YANO, T. (2002)

Hemagglutinating Factor (HAF) Associated with Adhesiveness in Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)

Microbiol. Immunol. **46**, 359-363

SMIT, H., GAASTRA, W., KAMERLING, J. P., VLIEGENTHART, J. F. G., and DE GRAAF, F. (1984)

Isolation and Structural Characterization of the Equine Erythrocyte Receptor for Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 Fimbrial Adhesin

Infect. Immun. **46**, 578-584

SMITH, H. W., and HALLS, S. (1967)

Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits

J. Pathol. Bacteriol. **93**, 499-523

SOBJINSKI, G. M. (1998)

Epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen darmpathogener *Escherichia coli*-Keime bei Kälbern aus Milchviehbeständen

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere. Vet. Diss. Justus-Liebig-Universität, Giessen

STEVENS, M. P., MARCHES, O., CAMPBELL, J., HUTER, V., FRANKEL, G., PHILLIPS, A. D., OSWALD, E., and WALLIS, T. S. (2002a)

Intimin, Tir, and Shiga Toxin 1 Do Not Influence Enteropathogenic Responses to Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Bovine Ligated Intestinal Loops

Infect. Immun. **70**, 945-952

STEVENS, M. P., VAN DIEMEN, P. M., FRANKEL, G., PHILLIPS, A. D., and WALLIS, T. S. (2002b)

Efa1 Influences Colonization of the Bovine Intestine by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes O5 and O111

Infect. Immun. **70**, 5158-5166

SUAREZ, S., CELEMIN, C., ZDUNCZYR, E., MEDINA, E., and WILLIAMS, P. H. (1995)

Aerobactin production by enterotoxigenic *Escherichia coli* of porcine Intestine

Vet. Microbiol. **47**, 229-233

SUEYOSHI, M., and NAKAZAWA, M. (1994)

Experimental Infection of Young Chicks with Attaching and Effacing *Escherichia coli*

Infect. Immun. **62**, 4066-4071

TADA, H., SHIHO, O., KUROSHIMA, K., KOYAMA, M., and TSUKAMATO, K. (1986)

An improved colorimetric assay for interleukin 2

J. Immunol. Methods. **3**, 157-165

TALBOT, U. M., PATON, J. C., and PATON, A. W. (2005)

Protective Immunization of Mice with an Active-Site Mutant of Subtilase Cytotoxin of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*

Infect. Immun. **73**, 4432-4436

TAUSCHEK, M., GORRELL, R. J., STRUGNELL, R. A., and ROBINS-BROWNE, R. M. (2002)

Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*

PANS. **99**, 7066-7071

- TAVECHIO, A. T., MARQUES, L. R. M., ABE, C. M., and GOMES, T. A. (2004)  
Detection of Cytotoxic Necrotizing Factor Types 1 and 2 among Fecal *Escherichia coli* Isolates from Brazilian Children with and without Diarrhea  
Mem. Inst. Oswaldo. Cruz, Rio de Janeiro. **99**, 81-83
- TAYLOR, P. W. (1983)  
Bactericidal and Bacteriolytic Activity of Serum Against Gram-Negative Bacteria.  
Microbiol. Rev. **47**, 46-83
- THARIATH, A., SOCHA, D., VALVANO, M. A., and VISWANATHA, T. (1993)  
Construction and Biochemical Characterization of Recombinant Cytoplasmic Forms of the lucD Protein (Lysine: N<sup>6</sup>-Hydroxylase) Encoded by the pColV-K30 Aerobactin Gene Cluster  
J. Bacteriol. **175**, 589-596
- TO, S. C. M. (1984)  
F41 Antigen Among Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Lacking K88, K99 and 987P Pili  
Infect. Immun. **43**, 549-554
- TORRES, A. G., ZHOU, X., and KAPER, J. B. (2005)  
Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to Epithelial Cells  
Infect. Immun. **73**, 18-29
- TOTH, I., HERAULT, F., BEUTIN, L., and OSWALD, E. (2003)  
Production of Cytolethal Distending Toxins by Pathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Human and Animal Sources: Establishment of the Existence of a New *cdt* Variant (Typ IV)  
J. Clin. Microbiol. **41**, 4285-4291
- TZIPORI, S., GIBSON, R., and MONTANARO, J. (1989)  
Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors.  
Infect. Immun. **57**, 1142-1150

- VAN BOST, S., BABE, M. H., JACQUEMIN, E., and MAINIL, J. (2001a)  
Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970  
Vet. Microbiol. **82**, 311-320
- VAN BOST, S., ROELS, S., and MAINIL, J. (2001b)  
Necrotoxicogenic *Escherichia coli* type-2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum-restricted newborn calves  
Vet. Microbiol. **81**, 315-329
- VAN BOST, S., JACQUEMIN, E., OSWALD, E., and MAINIL, J. (2003a)  
Multiplex PCRs for Identification of Necrotoxicogenic *Escherichia coli*  
J. Clin. Microbiol. **41**, 4480-4482
- VAN BOST, S., ROELS, S., OSWALD, E., and MAINIL, J. (2003b)  
Putative roles of the CNF2 and CDTIII toxins in experimental infections with necrotoxicogenic *Escherichia coli* type 2 (NTEC2) strains in calves  
Microbes. Infect. **5**, 1189-1193
- VAZ, T. M. I., IRINO, K., KATO, M. A. M. F., DIAS, A. M. G., GOMES, T. A. T., MEDEIROS, M. I. C., ROCHA, M. M. M., and GUTH, B. E. C. (2004)  
Virulence Properties and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, from 1976 through 1999  
J. Clin. Microbiol. **42**, 903-905
- VIAL, P. A., ROBINS-BROWNE, R., LIOR, H., PRADO, V., KAPER, J. B., NATARO, J. P., MANEVAL, D., ELSAYED, A., and LEVINE, M. M. (1988)  
Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease  
J. Infect. Dis. **158**, 70-79
- VIBOUD, G. I., JOUVE, M. J., BINSZTEIN, N., VERGARA, M., RIVAS, M., QUIROGA, M., and SVENNERHOLM, A. M. (1999)  
Prospective Cohort Study of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections in Argentinean Children  
J. Clin. Microbiol. **37**, 2829-2833

WANI, S. A., BHAT, M. A., SAMANTA, I., NISHIKAWA, Y., and BUCHH, A. S. (2003)  
Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhoea in India  
Lett. Appl. Microbiol. **37**, 121-126

WALES, A. D., WOODWARD, M. J., and PEARSON, G. R. (2005)  
Attaching-effacing Bacteria in Animals  
J. Comp. Path. **123**, 1-26

WATERS, V. L., and CROSA, J. H. (1991)  
Colicin V Virulence Plasmids  
Microbiol. Rev. **55**, 437-450

WEISS, R., HERBST, W., and BALJER, G. (2003)  
Virale und bakterielle Ursachen der Kälberdiarrhoe  
Vortrag ATF "Reproduktionsmedizin Rind", Modul 4: Tierärztliche Betreuung des neonatalen Kalbes, 20-21. 9. 2003 Giessen

WHITFIELD, C., KEENLEYSIDE, W. J., and CLAREK, B. R. (1994)  
Structure, Function and Synthesis of Surface Polysaccharides in *Escherichia coli*  
In Gyles, C. L. (ed.) *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, pp, 437-494

WIELER, L. H., BAUERFEIND, R., and BALJER, G. (1992)  
Characterization of Shiga-like Toxin Producing *Escherichia coli* (STLEC) Isolated from Calves with and without Diarrhoea  
Zbl. Bakt. **276**, 243-253

WIELER, L. H., FRANKE, S., MENGE, C., ROSE, M., BAUERFEIND, R., KARCH, H., and BALJER, G. (1995)  
Untersuchungen zur Immunantwort bei der Ödemkrankheit von Absetzferkeln mit einer rekombinanten B-Untereinheit des Shiga-like-Toxins-II  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **102**, 40-43



WIELER, L. H., JORES, J., and LÜBKE-BECKER, A. (2002)

*Escherichia coli* und andere bakterielle Erreger bei der Kälberdiarrhoe

Vet. MedReport. **Sonderausgabe V4, 26 Jahrgang**, 2-3

WIELER, L. H., SCHWANITZ, A., VIELER, E., BUSSE, B., STEINRÜCK, H., KAPER, J. B., and BALJER, G. (1998)

Virulence Properties of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Strains of Serogroup O118, a Major Group of STEC Pathogens in Calves

J. Clin. Microbiol. **36**, 1604-1607

WIELER, L. H., VIELER, E., ERPENSTEIN, C., SCHLAPP, T., STEINRÜCK, H., BAUERFEIND, R., BYOMI, A., and BALJER, G. (1996)

Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains from Bovines: Association of Adhesion with Carriage of *eae* and Other Genes

J. Clin. Microbiol. **34**, 2980-2984

WOLF, M. K. (1997)

Occurrence, Distribution and Associations of O and H Serogroups Colonization Factor Antigens, and Toxins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*

Clin. Microbiol. Rev. **10**, 569-584

WOODWARD, M. J., and WRAY, C. (1990)

Nine DNA probes for detection of toxin and adhesin genes in *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal disease in animals

Vet. Microbiol. **25**, 55-65

WRAY, C., MCLAREN, I. M., and CARROLL, P. J. (1993)

*Escherichia coli* isolated from farm animals in England and Wales between 1986 and 1991

Vet. Res. **133**, 439-442

YAMAMOTO, T., and NAKAZAWA, M. (1997)

Detection and Sequences of the Enteraggative *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin1 Gene in Enterotoxigenic *E.coli* Strains Isolated from Piglets and Calves with Diarrhea

J. Clin. Microbiol. **35**, 223-227

YAMAMOTO, T., WAKISAKA, N., NAKAE, T., KAMANO, T., SERICHANTALERGS, O.,  
and ECHEVERRIA, P. (1996)

Characterization of a Novel Hemagglutinin of Diarrhea-Associated *Escherichia coli* that  
has Characteristics of Diffusely Adhering *E.coli* and Enteroaggregative *E.coli*

Infect. Immun. **64**, 3694-3702

## 8 Anhang

**Tabelle 22: Verwendete Chemikalien**

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nummer
Agarose-D-1 Low EEG	Fa. Pronadisa, Laboratorios Conda S.A., Spanien	8016
Agar-Agar	Fa. Merck, Darmstadt	1.01614.1000
Blut-Agar (Basis)	Fa. Merck, Darmstadt	1.10886
BPLS-Agar	Fa. Merck, Darmstadt	1.10747.0500
CASO-Bouillon	Fa. Merck, Darmstadt	1.05458.0500
Casminoacid	Fa. Difco, Augsburg	0230-01-1
Columbia-Agar	Fa. Merck, Darmstadt	1.10455.0500
D-Glukose (Wasserfrei)	Fa. Merck, Darmstadt	K28692537.107
Eisessig	Fa. Merck, Darmstadt	50190259
Essigsäure, 96 %-ig	Fa. Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe	3738.2
Ethanol	Fa. Merck, Darmstadt	1.00983.1011
Ethidiumbromid 1 %-ige-Lösung	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	21251
Fötale Kälberserum (FKS)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	F-7524
Gassner	Fa. Oxoid, Wesel	V W 625582
Gelatine	Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co. Heidelberg	22151
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM 0241
Glutamin	Fa. Merck, Darmstadt	289
Glycerin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	G-7893
Hefe-Extrakt	Fa. Merck, Darmstadt	1.03753
HEPES	Fa. Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg	5288
Kaliumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt	4936.500
Kaliumdihydrogenphosphat	Fa. Merck, Darmstadt	4873

Fortsetzung der **Tabelle 22** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 22**

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikel-Nummer</b>
Methyl-alpha D-Mano-Pyranosid	Fa. ICN Biomedicals Inc.	67770
Mineralöl	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	M-5904
MTT [3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)- 2,5-dipenyltetrazoliumbromid]	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	M-2128
Na-EDTA x 2H <sub>2</sub> O	Fa. Serva, Heidelberg	11280
Natriumchlorid	Fa. Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe	3957.2
Natriumcitrat	Fa. Merck, Darmstadt	1.06448.1000
di-Natriumhydrogenphosphat reinst (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Fa. Merck, Darmstadt	6345
NH <sub>4</sub> -Mix	Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach	MB-1101000
Nukleotide	Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach	PAN 739026
Paraffin	Fa. Merck, Darmstadt	7158
Polymyxin-B-Sulfat	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	P 4932
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Fa. PAA, Linz, Österreich	P 11-010
Phenol	Fa. Merck, Darmstadt	200.1000
RPMI 1640-Medium	Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	51800-035
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	20763
Standard-I-Nährbouillon	Fa. Merck, Darmstadt	1.07882.0500
PAN-Polymerase	Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach	MB-1101000
Tris (tris-Hydroxymethyl- Aminomethan)	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe	4855
Trypsinlösung 0,25 %	Fa. Gibco, Eggenstein	25050-022
Trypton	Fa. Difco, Augsburg	123-17-3

**Tabelle 23: Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Anaerobiertopf	Fa. Oxoid, Hampshire, GB
Autoklav FVS/2	Fa. FEDEGARI, ORT. Italien
Brutschrank Typ BB 6220	Fa. Heraeus, Hanau
Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. 429K	Fa. Herolab, Wiesloch
Eismaschine UBE-50-35	Fa. Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammern	Fa. Hybaid AGS, Heidelberg
Eppendorf-Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Zentrifuge 5415C	Fa. Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Kühl- und Gefrierschrank	Fa. Bosch, Jungingen
Mehrkanalpipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Microprocessor pH-Meter pH537	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Mikrowellenofen 2915Q	Fa. Moulinex, Hamburg
Neubauer-Zählkammer(tiefe 0,100 mm)	Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Plattenphotometer	Fa. Labsystems GmbH, Meckenheim
Titertek Multiskan Ascent 354	
Spectrophotometer DU 640	Fa. Beckmann, Frankfurt
Thermocycler PE 2400	Fa. Perkin Elmer, Überlingen
Thermocycler PE 9600	Fa. Perkin Elmer, Überlingen
Tischzentrifuge 5415C	Fa. Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Fa. Roth, Karlsruhe
Wasserbad GFL	Medizin und Labortechnik Kretschmer, Giessen
Zentrifuge 500R	Fa. Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 24: Verwendetes Verbrauchsmaterial**

<b>Artikel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
AnaeroGen™ AN 25	Fa. Oxoid, Hampshire, GB
Eppendorfgefäße	Fa. MAGV Radenau-Londorf
F-96-Mikrotiterplatten	Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark
Kotröhrchen	Fa. Merck, Darmstadt
Objektträger	Fa. IdL GmbH+Co. KG, Nidderau
PCR-Reaktionsgefäße 100 µl	Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen	Fa. MAGV, Rabenau-Londorf
Plastik-Zellkulturflasche (80 cm <sup>2</sup> )	Fa. Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße 0,5 ml/ 1,5 ml/ 2 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 50 ml	Fa. Geriner Nütringen
U-96-Mikrotiterplatte	Fa. Nunc, Wiesbaden
Polysorp	

## Verwendete Puffer und Medien

### BPLS

BPLS-Agar	51,5 g
Agar-Agar	1,5 g
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

### Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE)

Tris	242 g
Eisessig	57,1 g
Na-EDTA x 2H <sub>2</sub> O (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

### Ethidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid	100 µl
<i>A. dest</i>	ad 100 ml

### Gassneragarplatte

Gassner-Agar	77 g
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

### GVBS (Gelatine-Veronal-Puffer-Salzlösung)

Gelatine	0,5 g
5 x VBS	ad 100 ml

### HEPES-Puffer Stammlösung (10 x, pH 7,4)

NaCl	40 g
KCl	1,5 g
HEPES	11,9 g
D-Glukose (Wasserfrei)	10 g
<i>A. dest</i>	ad 500 ml

### HEPES-Puffer (1 x, pH 7,4)

HEPES-Puffer Stammlösung	50 ml
<i>A. dest</i>	ad 500 ml

### Leberbouillon nach Tarozzi

Standard 1-Nährbouillon	12,5 g
Rinderleber	2-3 Stückchen/10 ml
Agar-Agar	0,1 %
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

**Luria-Bertani-Medium-flüssig**

Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
NaOH 1 N	4.ml
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

**MTT-Lösung (5 mg/ml)**

MTT	0,50 g
PBS-Lösung	100 ml

**Mincaagarplatten**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,36 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	10,1 g
Casamino acids	1 g
Spurenelement Mischung	1 ml
Agar-Agar	15 g
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

**Minca-Bouillon**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,36 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	10,1 g
Casamino acids	1 g
Spurenelement Mischung	1 ml
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

Nach dem Autoklavieren

Zusatz von:	Isovitalex	10 ml
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	10 g
	MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1 g
	FeCl <sub>3</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,135 g
	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,40 g
	<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

**NaCl-Lösung (0,89 %)**

NaCl	8,9 g
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml



**Natrium-Citrat-Lösung (3,8 %)**

Natrium-Citrat	25 g
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

**NBI-Bouillon**

Standard 1-Nährbouillon	25 g
<i>A. dest</i>	100 ml

**PBS-Stammlösung (10 x, pH 7,4)**

NaCl	100 g
KCl	2,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	18 g
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

**PBS-Lösung (pH 7,4)**

PBS-Stammlösung	100 ml
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

**RPMI-Medium**

RPMI 1640	880 ml
FKS	100 ml
Penicillin (10.000 IE/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml)-Lösung	10 ml
Glutamin-Lösung (200 mM)	10 ml

**Schafblutagar**

Blut-Agar (Basis)	50 g
Defibriniertes Schafblut	50 ml
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

**10 %-ige SDS-Lösung**

Natriumdodecylsulfat	100 g
HCl 1 N	10 ml
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

**1 %-ige SDS-Lösung**

Natriumdodecylsulfat	0,5 g
NaCl	ad 50 ml

**Trypanblau-Lösung**

Trypanblau	0,20 g
NaCl-Lösung	1000 ml

**TSB (Tryptose-Soja-Bouillon)**

CASO-Bouillon	30 g
<i>A. dest</i>	1000 ml

**5 x VBS (Veronal-Puffer-Salzlösung) (pH 7,35)**

Natriumbarbital	5,1 g
NaCl	41,5 g
HCl 1 N	17,3 ml
MgCl <sub>2</sub> 2M	1,6 ml
CaCl <sub>2</sub> 0,3 M	0,49 ml
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

**Zeissler-Nährboden**

Columbia-Agar	52 g
Glukose	10 g
Schafblut	50 ml
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die stets gewährte Unterstützung.

Meine besonderer Dank gilt Herrn Dr. Reinhard Weiß für seine jederzeit gewährte fachliche Betreuung, freundschaftliche Unterstützung und Anregungen.

Dank auch an Herrn Dr. W. Herbst für die Erhebung der virologischen Befundes, sowie an Herrn Dr. habil. C. Menge und Frau Dr. S. Barth für die Mithilfe bei einigen Tests.

Allen Doktoranden und Mitarbeitern des Institutes danke ich für gute Zusammenarbeit und schöne Zeit.

Mein großer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir durch ihre seelische Unterstützung und Glauben an mich haben. Ohne ihr großes Verständnis und ihr jederzeit offenes Ohr für die kleinen und großen Schwierigkeiten hätte ich diese nicht so gut bewältigen können.

Besonders bedanken möchte ich mich jedoch bei meinem Mann Abdulbasat Alabiedi, der in dieser nicht immer leichten Zeit stets hinter mir gestanden hat. Sein in mich gesetztes Vertrauen hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Erklärung nach § 10, Absatz 5 der Promotionsordnung der Justus-Liebig-Universität  
Gießen:

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5253-6

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de



9 1783835 19 52539